

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra antropologie a genetiky člověka
Praha



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Význam trombofilních mutací v klinické genetice.
Importance of trombophilic mutations in clinical genetics.

Bc. Klára Vavrušková

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Miloslav Kuklík, CSc.
Pracoviště lékařské genetiky, Olšanská 7

2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce MUDr. Miloslava Kuklíka, CSc. na PřF UK a na pracovišti lékařské genetiky Olšanská 7, za použití níže uvedených literárních zdrojů.

V Praze dne 20. srpna 2010

Bc. Klára Vavrušková v. r.

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce MUDr. Miloslavovi Kuklíkovi, CSc. za odborné a laskavé vedení při sestavování této diplomové práce, za poskytnuté cenné rady a celkovou pracovní i duchovní podporu. Děkuji také RNDr. Petrovi Matouškovi z Krajské nemocnice Liberec za trpělivou pomoc po metodické stránce práce.

V neposlední řadě samozřejmě děkuji své rodině a svým blízkým, bez kterých by mé studium nebylo umožněno, za jejich pomoc, trpělivost a podporu během celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE.....	10
3	SEZNAM ZKRATEK.....	11
4	LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
4.1	FYZIOLOGIE KREVNÍHO SRÁŽENÍ	14
4.1.1	Podmínky vzniku trombózy	17
4.1.2	Žilní a tepenná trombóza	18
4.2	KLINICKÉ MANIFESTACE TROMBOFILNÍCH STAVŮ	19
4.2.1	Infarkt myokardu.....	19
4.2.2	Cévní mozková příhoda.....	19
4.2.3	Hluboká žilní trombóza	20
4.2.4	Plicní embolie	21
4.3	TROMBOFILNÍ STAVY.....	22
4.4	VROZENÉ TROMBOFILIE	24
4.4.1	Mutace FV - Leiden	24
4.4.2	Mutace protrombinu	26
4.4.3	Deficit proteinu C.....	27
4.4.4	Deficit proteinu S	28
4.4.5	Deficit antitrombinu III	30
4.4.6	Mutace v genu pro MTHFR.....	31
4.4.7	Nedostatek faktoru XII	33
4.4.8	Zvýšená hladina faktoru VIII.....	33
4.4.9	Zvýšená hladina inhibitoru aktivátoru plazminogenu PAI-1	34
4.5	TROMBOFILNÍ STAVY A TĚHOTENSTVÍ	34
4.6	TROMBOFILNÍ STAVY A PERORÁLNÍ KONTRACEPTIVA	35
4.7	TROMBOFILNÍ STAVY U DĚTÍ.....	36
5	MATERIÁL	38
5.1	SOUBOR PROBANDŮ.....	38
5.2	PŘÍSTROJOVÁ TECHNIKA A POMŮCKY	39
5.3	CHEMIKÁLIE, REAKTANTY, KITY	39
6	METODIKA PRÁCE	40
6.1	IZOLACE LIDSKÉ GENOMOVÉ DNA Z PLNÉ NESRÁŽLIVÉ KRVÉ KITEM HIGH PURE PCR TEMPLATE PREPARATION KIT	40

6.1.1	Požadavky na vzorek	40
6.1.2	Princip metody	40
6.1.3	Příprava setu	40
6.1.4	Vlastní postup	41
6.2	DETEKCE A GENOTYPIZACE JEDNOBODOVÉ MUTACE G1691A LIDSKÉHO GENU PRO FV (LEIDENSKÁ MUTACE) A MUTACE G20210A GENU PRO FII (PROTROMBIN)	42
6.2.1	Amplifikace metodou PCR	42
6.2.1.1	Příprava master mixu a amplifikace	43
6.2.1.2	Real-time PCR analýza využívající FRET sondy	44
6.3	DETEKCE A GENOTYPIZACE JEDNOBODOVÝCH MUTACÍ C677T A A1298C LIDSKÉHO GENU PRO 5,10-METHYLENTETRAHYDROFOLÁT REDUKTÁZU (MTHFR).....	46
6.3.1	Amplifikace metodou PCR.....	46
6.3.2	Real-time PCR analýza využívající FRET sondy.....	48
6.4	STATISTICKÉ HODNOCENÍ	49
7	VÝSLEDKY	50
7.1	KLINICKÉ KONSEKVENCE U PACIENTŮ MAJÍCÍCH TROMBOFILNÍ MUTACE.....	52
7.1.1	Klinické konsekvence u pacientů s mutací MTHFR C677T	52
7.1.2	Klinické konsekvence u pacientů s mutací MTHFR A1298C	54
7.1.3	Klinické konsekvence u pacientů s mutací Leiden nebo protrombinovou mutací.....	55
7.1.4	Klinické konsekvence u pacientů s více trombofilními mutacemi současně..	56
7.1.5	Souhrnný přehled klinických konsekvencí u pacientů s trombofilními mutacemi	60
7.2	SROVNÁNÍ KLINICKÝCH KONSEKVENCÍ MEZI HETEROZYGOTY A HOMOZYGOTY TROMBOFILNÍCH MUTACÍ	61
7.3	SPONTÁNNÍ ABORTY A TROMBOFILNÍ MUTACE.....	62
7.4	FAMILIÁRNÍ VÝSKYT A ZPŮSOB DĚDĚNÍ.....	62
8	DISKUSE A SROVNÁVÁNÍ S LITERATUROU	65
8.1	POTRATY.....	69
8.2	LÉČEBNĚ PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ V SOUVISLOSTI S TROMBOFILNÍM STAVEM	71
9	ZÁVĚR.....	72
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	74
11	PŘÍLOHY	82
11.1	TABULKY	82
11.2	GRAFY	92

ABSTRAKT

Trombofilie znamená zvýšenou dispozici k tvorbě trombů. Zdravotní komplikace vzniklé v důsledku zvýšené srážlivosti krve mohou být velmi vážné. Pozitivní stanovení trombofilních mutací pak znamená pro pacienta nutnost prevence trombózy v rizikových situacích (např. těhotenství, operace) po celý život.

Do studie klinického významu trombofilních mutací bylo zařazeno 300 lidí (206 žen a 94 mužů) s trombofilními mutacemi, kteří byli vyšetřeni v letech 2008 – 2010.

Největší výtěžnost byla v oblasti mutací MTHFR (C677T i A1298C) - 266 pozitivních nálezů. Menší výtěžnost byla v oblasti sledování mutací FV Leiden a mutace FII protrombinu. U 99 pacientů byly zjištěny vícečetné trombofilní mutace.

V souladu se zahraniční literaturou naše výsledky poukazují na klinické konsekvence trombofilních mutací jako jsou: opakované spontánní aborty, cévní mozková příhoda, ischemická choroba srdeční, trombóza, flebotrombóza, plicní embolie, varixy, aseptická nekrose kyčelního kloubu, ateroskleróza a stenóza aorty. Mutace MTHFR C677T a MTHFR A1298C byly zachyceny především u pacientů s CMP, IM a ICHS. Mutace Leiden byla nejčastěji zachycena u pacientů s trombózou, flebotrombózou a plicní embolií.

Ověřili jsme familiární výskyt trombofilních mutací. Všichni pacienti zdědili trombofilní mutace po jednom nebo obou rodičích. Žádnou čerstvou mutaci jsme nezaznamenali. Mutace FV Leiden a mutace FII protrombinu jsou děděny autozomálně dominantním způsobem. Mutace MTHFR C677T a MTHFR A1298C jsou děděny autozomálně neúplně dominantně.

V mém souboru bylo 51 pacientek, které prodělaly spontánní abort. U pacientek s mutací MTHFR A1298C v homozygotním stavu potratilo spontánně celkem 64 % pacientek (n = 14), tedy velmi vysoké procento. Pacientky s mutací MTHFR C677T v homozygotním stavu spontánně potratily ve 47,6 % (n = 21). U těchto pacientek byl také zaznamenán výskyt rozštěpových vad.

Hlavním přínosem této diagnostiky je možnost zvolit individuální přístup k léčbě pacientů a tím zvýšit její efektivitu. Zároveň tyto poznatky mohou přispět k vývoji nových terapeutických metod, větší efektivitě genetického poradenství a prekoncepční péče.

Klíčová slova: trombofilní mutace, mutace MTHFR C677T, mutace MTHFR A1298C, mutace faktoru V Leiden, protrombinová mutace, srážlivost krve, infarkt myokardu, trombóza, plicní embolie, vrozené trombofilie, trombofilní stavy.

ABSTRACT

Trombophilia means an increased disposition to creation of trombs. Health complication incurred as a consequence of hypercoagulation can be very serious. When a trombophilic mutation is found at a patient, it brings necassity of thrombosis – control in risk situations (e.g. pregnancy, operation) for the rest of the patient's life.

There were filed 300 people (206 women and 94 men) with trombophilic mutations into my study of clinical signifcation of trombophilic mutations. These people were examined in years 2008 – 2010.

Most of positive medical findings – 266 people, were recorded in the area of MTHFR (C677T i A1298C) mutations. There were less findings in the field of FV Leiden and FII prothrombin mutations. Multipath trombophilic mutations were found at 99 patients.

I accordance with foreign literature, our results advert to clinical consequences of trombophilic mutations like: repeated spontaneous abortions, cerebrovascular akcident (CA), ischaemic heart disease (IHD), thrombosis, flebothrombosis, pulmonary embolism, varicose veins, aseptic necrosis of hip bone, arterial sclerosis and aortic stenosis. Mutations MTHFR C677T and MTHFR A1298C we found mainly at patients with CA, IM and IHD. Leiden mutation was most often found at patients with thrombosis, flebothrombosis and pulmonary embolism.

We verified familiar presence of trombophilic mutations. All the patients inherited trombophilic mutations from one or both parents. We have not recorded any new mutation. FV Leiden and FII prothrombin mutations are inherited in autosomal dominant way. Mutations MTHFR C677T and MTHFR A1298C are inherited in autosomal incomplete dominant way.

There are 51 female patients who went through spontaneous abort in my file of female patients with mutation MTHFR A1298C in homozygous phase tend to have spontaneous abort – 64% of these female patients (n = 14) had it – which is a very high percentage. Female patients with mutation MTHFR C677T in homozygous phase had spontaneous abort in 47,6 % (n = 21). We also recorded fissure disease occurrence at these patients.

The main asset of this diagnostic is a possibility to choose an individual approach to treatment of patients and through it a possibility to increase effectivity of the treatment. At

the same time, these findings can contribute to envelopment of new therapeutical methods, higher effectivity of genetical counselling and pre-konceptual treatment.

Key words: trombophilic mutation, mutation MTHFR C677T, mutation MTHFR A1298C, factor V Leiden mutation, prothrombin mutation, coagulation of blood, infact of myocard, thrombosis, pulmonary embolism, congenital trombophilics, trombophilic states.

1 ÚVOD

Destičkami zprostředkovaná hemostáza a koagulace se evolučně vyvinuly jako ochrana před krvácením. Hlavním spouštěcím mechanismem je poškození endotelu. Integrita cévního systému je zajištěna dokonalou souhrou krevních destiček, cévní stěny a plazmatických bílkovin, zahrnujících koagulační faktory a jejich inhibitory. Přírodní inhibitory koagulace slouží k lokalizaci cévního poškození, restrikci koagulačního procesu a také chrání nepoškozené cévy proti trombóze. Antitrombin III je přirozeným inhibitem trombinu a aktivních faktorů IX, X a XI a tvoří ireverzibilní komplexy s těmito proteázami. Prokoagulační aktivita trombinu je přímo inhibována trombomodulinem, který se nachází v membráně endotelu. Trombomodulin také urychluje aktivaci dalšího inhibitoru – proteinu C trombinem. Aktivovaný protein C spolu s dalším inhibitem koagulace proteinem S tvoří komplex, který účinně reguluje koagulaci inaktivací dvou kofaktorů – faktoru VIIIa a faktoru Va.

Tato koagulační kaskáda vede k aktivaci krevního srážení v místě cévního poranění, nezbytné k zabránění krevní ztráty. Souběžně musí být zajištěno omezení krevní sraženiny, s cílem zabránit okluzi cévního řečiště (systém inhibitorů koagulace). Trombóza vzniká, pokud dojde k převaze aktivace krevního srážení nad kapacitou inhibitorů koagulace a fibrinolytického systému nebo v místech nepřítomnosti proudění krve.

Aktivace procesu krevního srážení má častěji získanou, většinou krátkodobou příčinu, často spojenou s poraněním cévy nebo endoteliální dysfunkcí (operace, trauma, infekce, porod atd.), ale existují i vrozené dispozice ke zvýšené aktivaci krevního srážení. Snížená kapacita inhibitorů koagulace bývá často vrozená, ale existují i získané stavy s těmito poruchami (Malý, 2004).

Z genetického hlediska jsou zpravidla vyšetřovány klinicky významné mutace:

- mutace MTHFR (methylenetetrahydrofolát reduktáza) v mutačních místech C677T a A1298C
- faktor V - v mutačních místech G1691A (Leiden) a G1091C (Cambridge)
- faktor II (protrombin) v mutačním místě G20210A

2 CÍLE PRÁCE

1. Určit klinické konsekvence trombofilních mutací.
2. Zjistit a vyhodnotit trombofilní mutace u rizikových pacientů.
3. Ověřit familiární výskyt trombofilních mutací.
4. Popsat výskyt trombofilních mutací u pacientů s opakovanými aborty.

3 SEZNAM ZKRATEK

°C	-	stupeň Celsia
A	-	adenin (adenine)
APC	-	aktivovaný protein C (activated protein C)
APC-R	-	rezistence na aktivovaný protein C (activated protein C resistance)
Arg	-	arginin (arginine)
AT	-	antitrombin (antitrombine)
atd.	-	a tak dále
bp	-	párů bází (base pair)
C	-	cytosin (cytosine)
C4bBP	-	C4b-vazebný protein (C4b-binding protein)
Ca ²⁺	-	vápník (calcium)
cca	-	přibližně (circa)
CMP	-	cévní mozková příhoda
CNS	-	centrální nervový systém
č.	-	číslo
ČR	-	Česká republika
DNA	-	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleotid acid)
DQ	-	DarkQuencher
EPI	-	inhibitor zevní cesty koagulace (extrinsic pathway inhibitor)
FAM	-	5,6-karboxylfluorescein
FII	-	faktor II (factor II)
FIX	-	faktor IX (factor IX)
FV	-	faktor V (factor V)
FVII	-	faktor VII (factor VII)
FVIII	-	faktor VIII (factor VIII)
FX	-	faktor X (factor X)
FXI	-	faktor XI (factor XI)
FXII	-	faktor XII (factor XII)
FXIII	-	faktor XIII (factor XIII)
g	-	gram

G	-	guanin (guanine)
Gln	-	glutamin (glutamine)
Gly	-	glycin (glycine)
h.	-	hodina
het	-	heterozygot
homo	-	homozygot
ICHS	-	ischemická choroba srdeční
IM	-	infarkt myokardu (infarct of myocard)
kDa	-	kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)
kol.	-	kolektiv
l	-	litr
max.	-	maximálně
min.	-	minuta
ml	-	mililitr
mRNA	-	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
MTHFR	-	methylenetetrahydrofolát reduktáza (methylenetetrahydrofolate reductase)
např.	-	například
NYHA	-	funkční klasifikace srdečního selhání (New York Heart Association)
PAI-1	-	inhibitor aktivátoru plazminogenu (plasminogen activator inhibitor-1)
PAI-2	-	inhibitor aktivátoru plazminogenu (plasminogen activator inhibitor-2)
PCR	-	polymerasové řetězové reakce (polymerase chain reaction)
resp.	-	respektive
s	-	sekunda
TAFI	-	trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor)
TEN	-	tromboembolická nemoc (thromboembolism)
TF	-	tkáňový faktor (tissue factor)
TFPI	-	inhibitor tkáňového faktoru (tissue factor pathway inhibitor)
Thr	-	treonin (threonine)
tj.	-	to je
t-PA	-	tkáňový aktivátor plazminogenu (tissue plasminogen activator)
tzv.	-	takzvaný

u-PA	-	urokináza (urokinase plasminogen activator)
ÚZIS	-	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
VVV	-	vrozená vývojová vada

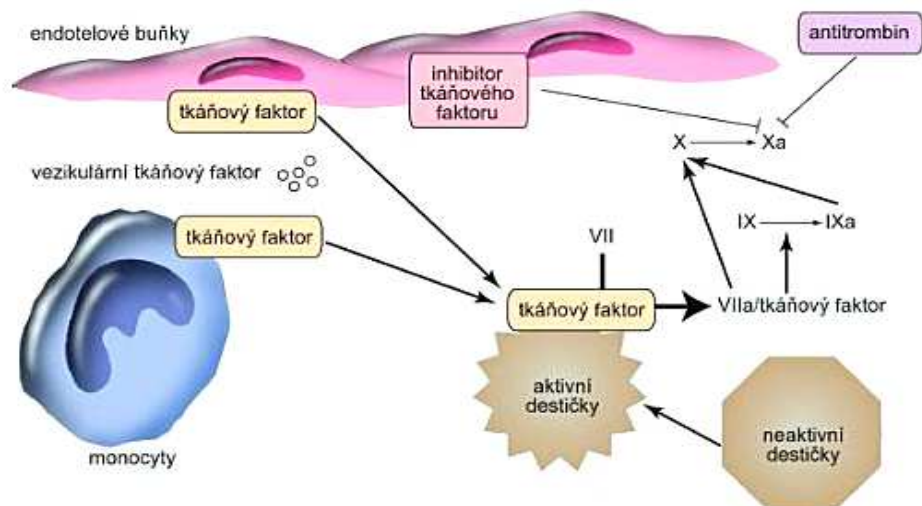
4 LITERÁRNÍ PŘEHLED

4.1 Fyziologie krevního srážení

Koagulační systém je tvořen kaskádou proteolytických reakcí, která má zamezit dvěma extrémním jevům, krvácení při cévním poškození a formování krevní sraženiny v cévním řečišti. Pokud dojde ke krvácení vlivem cévního poškození, jsou prostřednictvím poškozeného endotelu aktivovány trombocyty, které adherují na cévní stěnu a formují primární hemostatickou zátku. Vaskulární poškození zahájí spuštění koagulační kaskády, která díky působení tkáňového faktoru na jednotlivé faktory koagulační kaskády končí až tvorbou trombinu v místě poškození. Výsledkem aktivace plazmatických koagulačních faktorů je vytvoření stabilního fibrinu. Fibrin vytváří fibrinovou síť na trombocytovou matici, kterou tím zpevňuje. Vznik stabilního fibrinu je výsledkem vzájemného působení koagulačních plazmatických proteinů (Navrátil a kol., 2008; Malý, 2004; Penka a kol., 2001).

Pokud dojde k porušení cévní stěny, přichází krev do kontaktu s tkáňovým faktorem (TF), glykoproteinem vázaným na buněčné membrány. Je exprimován na povrchu aktivovaného endotelu a monocytů (obr. 1). Bylo prokázáno, že se membránové vezikuly s TF uvolňují z buněk a vážou se na povrch aktivovaných destiček. Tyto vezikuly se nenalezly na neaktivovaných destičkách, proto se předpokládá, že iniciace koagulace probíhá jinde než ostatní koagulační kroky. Faktor VII (FVII) se aktivuje navázáním se na TF, poté komplex FVIIa-TF aktivuje faktor IX (FIX) a faktor X (FX). Faktor V, který pochází převážně z aktivovaných destiček, je aktivován faktorem Xa. Tato cesta se nazývá zevní koagulační systém. Počáteční fáze koagulace může být rychle potlačena antitrombinem a inhibítorem tkáňového faktoru, protože se oba mohou navázat na aktivovaný Xa a tím ho neutralizovat (Giesen et al., 1999; Monkovic et al., 1990; Bouchard et al., 2001; Preissner, 2004).

Vnitřní koagulační systém je pro hemostázu in vivo méně důležitý. Tato cesta je zahájena po kontaktu s cizím povrchem (destičky i plazma se dostanou do kontaktu s extracelulární matrix), což vede k aktivaci faktoru XII (FXII). FXII aktivuje faktor XI (FXI) a ten dále FIX (Monroe et al., 1996; Preissner, 2004).



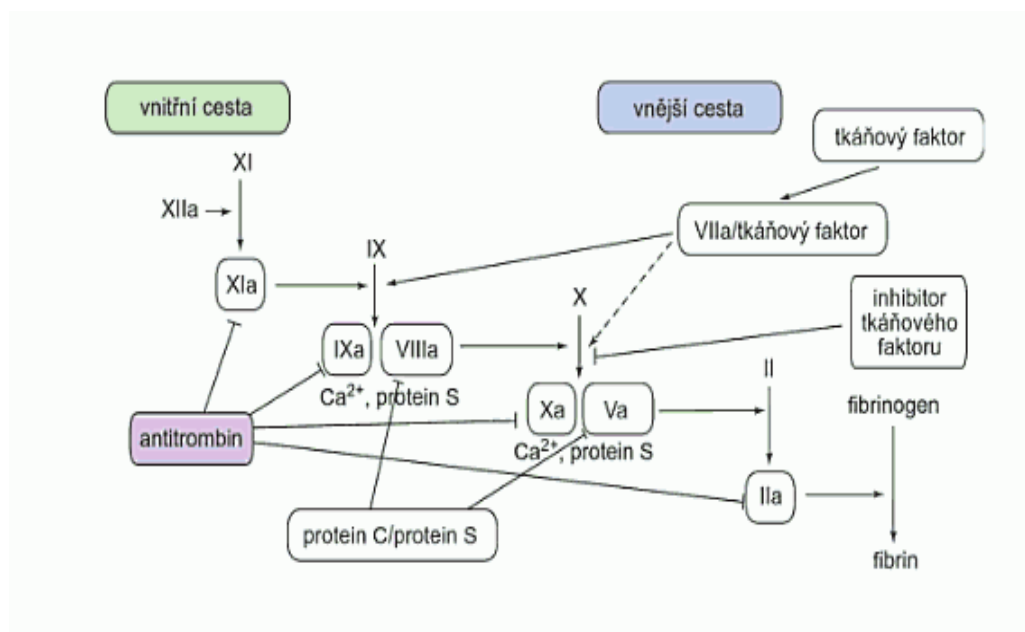
Obr. 1 Úloha tkáňového faktoru při koagulaci. Tkáňový faktor aktivuje faktor VII, který spolu s tkáňovým faktorem vede k přeměně faktoru X na aktivovaný faktor Xa, a zároveň aktivuje faktor IX na faktor IXa, což je „spojka“ mezi vnější a vnitřní aktivační cestou koagulační kaskády (Malý, 2004).

Další fáze koagulace je společná pro zevní i vnitřní koagulační systém. Faktor II (protrombin) je přeměněn vlivem FIX a FX na aktivní formu trombin, který zpětně aktivuje FXI a současně faktor V (FV) a faktor VIII (FVIII), ty jsou pak akcelerovány FIX a FX. Díky této fázi dojde ke vzniku dostatečného množství trombinu, který je zodpovědný za přeměnu fibrinogenu na fibrin. Působením faktoru XIII (FXIII), který je rovněž aktivován trombinem, poté vzniká definitivní fibrinové koagulum. K aktivaci faktorů II, VII, IX a X dochází na povrchu destiček za přítomnosti Ca^{2+} iontů a tím je proces koagulace situován do místa poranění. Klíčovým hemostatickým proteinem je trombin, který přeměňuje fibrinogen na fibrin, významně se podílí na aktivaci destiček a aktivuje koagulační faktory (Preissner, 2004).

Koagulační proces je regulován, aby nedocházelo k hyperkoagulaci, která není žádoucí. Inhibiční působení na hemostázu je spjato hlavně s endotelovými buňkami. Regulace koagulace se projevuje ve všech stupních koagulační kaskády, a to buď inaktivací kofaktorů, nebo inhibicí enzymů.

Vnější aktivační cesta koagulační kaskády je inhibována inhibitorem tkáňového faktoru (TFPI), který za fyziologického stavu slouží jako zdroj aktivovaného komplexu

VIIa, tkáňového faktoru a aktivovaného faktoru Xa (obr. 2). Chybění TFPI je zřejmě neslučitelné se životem, neboť deficit zatím nebyl u lidí popsán (u myši je úplný deficit TFPI letální (Huang et al., 1997).



Obr. 2 Schématické znázornění aktivace a inhibice koagulační kaskády (Malý, 2004).

Příliš velké množství trombinu vzniklé v místě poškození cévy by mohlo při proniknutí do cévního oběhu způsobit nekontrolovanou hyperkoagulaci, proto je trombin vychytáván antitrombinem v plazmě. Trombin se na povrchu endotelu váže na trombomodulin (transmembránový glykoprotein endotelové výstelky), čímž se účastní aktivace koagulačního inhibitoru – proteinu C. Aktivovaný protein C snižuje další tvorbu trombinu tím, že proteolyticky štěpí koagulační faktory FV a FVIII (Preissner, 2004; Nachman et al., 1993).

Inhibiční systém se aktivuje současně s aktivací koagulačního systému. Antitrombin je nejdůležitější koagulační inhibitor a jeho aktivita je zaměřena proti aktivovaným faktorům X, trombinu a také FXII, FXI a FIX. Protein S a protein C jsou další důležité inhibitory. Na povrchu endotelu je komplexem trombin-trombomodulin aktivován protein C, který inhibuje faktory Va a VIII. Protein S působí jako kofaktor proteinu C. Spolu s FX vytváří inhibitor zevní cesty koagulace (extrinsic pathway inhibitor – EPI) komplex, který pak efektivně inhibuje komplex TF-FVII a tím brání aktivaci koagulace. Neaktivní plazminogen je aktivátory fibrinolýzy, ke kterým patří tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) a urokináza (u-PA), přeměňován na aktivní plazmin. Těto

aktivaci brání inhibitory fibrinolýzy. Pro inhibici fibrinolýzy jsou důležité α -2-antiplazmin, tkáňové inhibitory aktivátoru plazminogenu (PAI-1, PAI-2) a trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI). (Doplen, 1999).

4.1.1 Podmínky vzniku trombózy

Trombóza v tepenném řečišti je ve většině případů podmíněna aterosklerotickým postižením cévní stěny, resp. rupturou ateromatózního plátu. Rozhodující je v tomto případě intenzita lokální aktivace hemostázy a dlouhodobé dispozice hrají jen malou roli.

Venózní tromboembolizmus vzniká většinou při souběhu dlouhodobé dispozice a aktuálně působící vyvolávající příčiny (Cushman, 2005; Kearon, 2001). Čím výraznější je dlouhodobá dispozice, tím slabší aktuální podnět stačí ke vzniku trombózy.

V krvi jsou přítomny systémy, které způsobují srážení krve, systémy, které naopak působí proti jejímu srážení a systémy, které vedou k rozpouštění vzniklé sraženiny. Za normálních okolností jsou všechny tyto systémy v dynamické rovnováze. Pokud dojde k převaze systému protisrážlivého, jsou vytvořeny podmínky pro vznik trombózy.

Pro vznik trombózy jsou rozhodující tyto tři předpoklady - Virchowova triáda (Malý, 2004):

- 1) zpomalení toku krve
- 2) hyperkoagulační stav krve (vrozená či získaná aktivita protisrážlivých systémů)
- 3) poškození žilní stěny

Trombózu dělíme podle přítomnosti vyvolávající příčiny do 3 skupin (Baglin et al., 2003):

- 1) trombóza provokovaná – se zjevnou přechodnou vyvolávající příčinou
- 2) trombóza s přetrvávající vyvolávající příčinou
- 3) trombóza idiopatická – bez zjevné vyvolávající příčiny

V mladších věkových kategoriích se nejčastěji vyskytuje trombóza provokovaná, protože riziko trombózy významně stoupá s věkem. Ve vyšších věkových kategoriích převažuje trombóza idiopatická (Kearon, 2001).

4.1.2 Žilní a tepenná trombóza

Stav zvýšené tendence k tvorbě trombů v žilách či arteriích se nazývá trombofilie. Při žilní trombóze dominuje zástava proudění krve a hyperkoagulace, k níž dochází při aktivaci plazmatických koagulačních faktorů a selhání funkce přirozených inhibitorů v krevní plazmě a cévní stěně. Pro arteriální trombózu je typická aktivace a agregace krevních destiček a dysfunkce endotelu, vyvolaná aterosklerotickým procesem při zánětu cévní stěny (Kvasnička, 2003c).

Vznik arteriálního trombu je tedy odlišný od vzniku trombu žilního. Klíčovou úlohu při tvorbě arteriálního trombu hrají krevní destičky. Proces tvorby trombu můžeme rozdělit do čtyř základních dějů a to na: adhezi trombocytů, agregaci trombocytů, propagaci trombocytů (v této fázi dochází k přeměně bílého destičkového trombu na červený) a maturaci trombocytů.

Vzhled intravaskulární sraženiny určuje zastoupení krevních elementů v základu trombu, kterým je fibrinová síť s trombocyty. Bílý trombus obsahuje hlavně lepkavá vlákna fibrinu (vzniká z protisrážlivých bílkovin), trombocyty a málo erytrocytů, zatímco

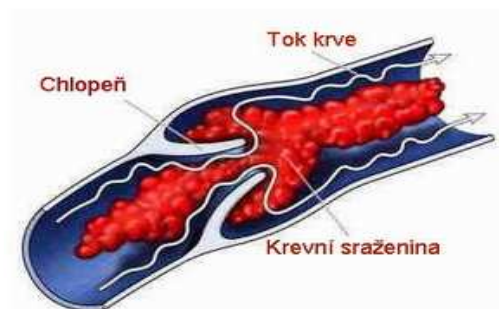


červený trombus je složen převážně z erytrocytů. Bílý trombus se tvoří především v arteriích a červený v žilách. Tepenné krevní sraženiny jsou hlavním důvodem vzniku infarktu myokardu a cévní mozkové příhody, krevní sraženiny v žilním řečišti způsobují hlavně hlubokou žilní trombózu a plicní embolii (Malý, 2004).

Obr. 3 Trombus – vlákna fibrinu s krevními elementy
(<http://cache.eb.com/eb/image?id=98328&rendTypeId=4>).

4.2 Klinické manifestace trombofilních stavů

4.2.1 Infarkt myokardu



Obr. 4 Krevní sraženina (www.rescue112.cz).

rozsahu omezuje funkci srdce jako pumpy. Uzavření koronární tepny může být trvalé, v lepším případě jen přechodné. Uzavření koronární tepny je pro organismus velmi stresující stav, který může způsobit i život ohrožující arytmie, především tachykardii nebo komorovou fibrilaci.

Mezi typické subjektivní příznaky patří především pálivá, tlaková nebo křečovitá bolest za hrudní kostí (stenokardie), s šířením mezi lopatky, do krku nebo do levé ruky. Tato bolest trvá déle než 20 minut. Objektivně bývá tachykardie, může být i bradykardie, bledost, opocenost, zvracení, nauzea, dušnost.

Akutní infarkt myokardu je život ohrožující stav a proto je důležité včasné zajištění odborné první pomoci (Ertlová et al., 2004).

4.2.2 Cévní mozková příhoda

Cévní mozkové příhody vznikají až z 80 - 85 % na podkladě uzávěru (okluze mozkové cévy vedoucí k ischemii). Tepna se uzavře krevní sraženinou, která se utvoří uvnitř cévy (trombus), nebo která vznikla na jiném místě a embolizovala do centrální nervové soustavy. Dále rozlišujeme cévní mozkové příhody na podkladě prasknutí mozkové cévy a mající za následek krvácení. Rozlišujeme krvácení mezi povrchem vlastního mozku a pavučnicí tzv. subarachnoideální krvácení, krvácení přímo do mozkové

tkáňě tzv. intracerebrální krvácení a krvácení pod tvrdou plenu mozkovou tzv. subdurální krvácení.

Mezi projevy patří změny vědomí, náhle vzniklé prudké bolesti hlavy, poruchy řeči, oboustranné nebo jednostranné ochabnutí lícních svalů (pokles koutku úst), poruchy hybnosti, nekoordinovanost pohybů, ochrnutí nebo ztráta cití na jedné nebo více končetinách, poruchy rovnováhy, zhoršení chůze, poruchy vidění, jednostranná ztráta sluchu, závratě, nauzea, zvracení atd. (Ertlová et al., 2004).

4.2.3 Hluboká žilní trombóza

Hluboká žilní trombóza je onemocnění hlubokého žilního systému, které je způsobeno úplným nebo částečným uzávěrem žíly trombem. Obvykle vzniká v hlubokých žilách lýtkových, stehenních nebo pánevních. Roční incidence hluboké flebotrombózy dolních končetin se odhaduje na 1 - 2 případy na 1000 obyvatel. V prvních třiceti letech života je desetkrát méně častá a postupně narůstá s věkem. V ojedinělých případech postihuje i děti. Výskyt bez rozdílu pohlaví, ale průměrný věk, ve kterém onemocní muži hlubokou žilní trombózou, je nižší (66 let) než u žen (72 let) (Silverstein et al., 1998).

Kvasnička popisuje projevy hluboké žilní trombózy jako náhlý otok končetiny, šklabavé bolesti v lýtku, bolestivost končetiny při zvýšení žilního tlaku, její bledost nebo cyanóza a poruchy citlivosti. Dále může být přítomná zvýšená teplota a zrychlení pulzu. V ojedinělých případech bývají pozitivní plantární příznak, který se projevuje bolestí při tlaku uprostřed chodidla, a Homanův příznak (bolest lýtky při palpaci a plantární flexi). Při ileofemorální trombóze a trombóze v pánevních žilách se mohou objevit kolaterály, které nahrazují ztrombotizovanou cévu hlubokého systému žil, v oblasti třísla nebo mohou být vidět v břišní krajině jako tzv. hlava medúzy - caput medusae. Závažný je stav, kdy je žilní trombóza provázena zvětšením objemu celé dolní končetiny a silnými bolestmi (Kvasnička, 2003b).

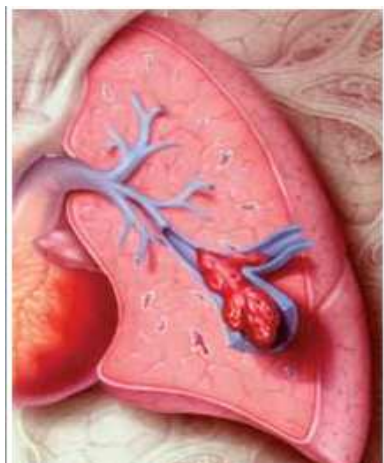
Hluboká žilní trombóza prodělaná v minulosti je samostatným rizikovým faktorem. Asi 25 % pacientů s akutní žilní trombózou hlubokého systému již prodělalo trombózu v minulosti. Vyšší riziko rekurence je u pacientů s idiopatickou trombózou. Primární hyperkoagulační stav je dán genetickou mutací v koagulačních faktorech, zahrnuje deficit

antitrombinu III, proteinu C, proteinu S, mutaci protrombinu a také rezistenci k aktivovanému proteinu C (APC rezistence).

Asi polovina prvních epizod žilního tromboembolismu u žen mladších 40 let má souvislost s těhotenstvím a je příčinou předčasných porodů a perinatální mortality (Toglietta et al., 1996).

4.2.4 Plicní embolie

Plicní embolií se rozumí zanesení embolu (vmetku) krevním proudem do plicní tepny nebo do její větve (dojde k uzavření cévy) s následnou poruchou hemodynamiky (výkonu srdce) a ventilace. Embolus je většinou trombus z hlubokých žil dolních končetin (vzniká při flebotrombóze), který putuje žilním systémem do plicnice nebo jejích větví. Druhý nejčastější trombus pochází z hlubokých žil pánevních, kde vzniká v důsledku aktivace systému srážení při velkých operacích, úrazech nebo při porodu. Jelikož je nejčastější původ embolů trombotický, většinou se užívá termín tromboembolická nemoc (TEN). Plicní embolie je nejzávažnější komplikace hluboké žilní trombózy.



Obr. 5 Krevní sraženina v plicích
(www.zbynekmlcoch.cz)

Celková úmrtnost u léčené plicní embolie dosahuje jen 8 % (Ertlová et al., 2004; Nejedlá et al., 2006).

Ertlová a Mucha řadí plicní embolii na třetí místo nejzávažnějších kardiovaskulárních onemocnění. Vzniká nejčastěji embolizací krevní sraženiny, která se uvolní při zánětu hlubokých žil dolních končetin. Toto může proběhnout bez jakýchkoliv příznaků, většinou však bývá bolestivost a otok postižené končetiny, především lýtky. Lze se setkat s masivní plicní embolií nebo i s tzv. sukcesivní embolizací, což jsou opakované drobné embolizace v plicích. Při masivní plicní embolii umírá 10 % pacientů do jedné hodiny s diagnózou „náhlá smrt“.

Při neléčené plicní embolii dosahuje celková úmrtnost 35 %.

4.3 Trombofilní stavy

Trombofilními stavy nazýváme získané nebo vrozené poruchy hemostázy, statisticky a patofyziologicky asociované se zvýšeným rizikem trombózy, jejichž nejvýznamnější klinickou manifestací je žilní tromboembolismus. Žilním tromboembolismem se rozumí hluboká žilní trombóza či plicní embolie. Vznik tromboembolické nemoci (TEN) je multifaktoriální proces, s podílem dočasných, získaných či prostředím podmíněných rizik a vrozených determinant. Lidé s vrozenými trombofiliemi mají proti osobám bez trombofilie především zvýšené riziko první tromboembolické nemoci. K tromboembolické příhodě dochází, pokud nejsou v rovnováze prokoagulační, protikoagulační a fibrinolytické procesy v organismu. Za trombofilní stav je považována zvýšená tendence ke vzniku trombóz a jejich recidivám, můžou být vrozené, získané či kombinované etiologie. O trombofilním pacientovi hovoříme při život ohrožujících trombotických příhodách v žilním řečišti do 45 let věku, při pozitivní rodinné anamnéze, vzniku trombózy v netypické lokalizaci a u žen také při opakovaných potratech či porodech mrtvých plodů.

Dosud známé klinicky významné vrozené trombofilie:

1. APC (aktivovaný protein C) rezistence způsobená mutací faktoru V
2. mutace faktoru V Leiden, faktoru V Cambridge atd.
3. mutace protrombinu G20210A
4. deficit antikoagulačních faktorů: deficit proteinu C, proteinu S, antitrombinu
5. dysfibrinogenémie
6. homozygotní homocystinurie
7. sticky platelet syndrom
8. deficit faktoru XII, trombomodulinu, plazminogenu (raritní)

Mezi klinicky významné získané trombofilní stavy řadíme:

1. antifosfolipidový syndrom
2. myeloproliferační onemocnění a trombocytémii
3. stav po prodělané trombóze
4. malignitu
5. srdeční nedostatečnost NYHA III a IV

6. závažné respirační onemocnění
7. autoimunitní choroby
8. graviditu a šestinedělí
9. léčbu estrogeny
10. paroxysmální noční hemoglobinurii
11. rezistenci k aktivovanému proteinu C nezpůsobenou mutací faktoru V
12. nefrotický syndrom
13. věk nad 60 let
14. chronické střevní záněty
15. obezitu
16. kouření
17. varixy dolních končetin
18. parézu končetin

Nejvýznamnější trombofilie smíšené etiologie:

1. zvýšená hladina faktoru VIII, podmíněná familiárně, asociovaná s krevní skupinou jinou než 0
2. hyperhomocysteinémie, která může být podmíněna mutací MTHFR C677T či A1298C, nedostatkem vitamínu B6, B12 či kyseliny listové
3. zvýšená hladina fibrinogenu
4. zvýšená hladina faktoru IX

U jednotlivých etnik se výrazně liší prevalence nejvýznamnějších trombofilních poruch jako jsou mutace faktoru V Leiden a protrombinu G20210A. Frekventovanější jsou u kavkazské populace, vzácně se vyskytují u Afričanů a Asiatů. Výskyt některých trombofilií v kavkazské populaci a u pacientů s TEN shrnuje tabulka č. 1 (Geerts et al., 2001; Schindler et al., 2005; Geerts et al., 2004; Delis et al., 2001).

Tabulka č. 1

Trombofilie	Prevalence v kavkazské populaci	Prevalence u pacientů s TEN
Zvýšená hladina faktoru VIII	11 %	25 %
Mutace faktoru V Leiden	4,8 %	18,8 %
Dysfibrinogenémie	8 %	15 %
Hyperhomocysteinémie	4,8 %	10 %
Mutace protrombinu 20210A	2,7 %	7,1 %
Deficit proteinu S	0,7 %	2,3 %
Deficit proteinu C	0,3 %	3,7 %
Deficit antitrombinu	0,2 %	3,0 %

4.4 Vrozené trombofilie

Pro vrozené hyperkoagulační stavy, nazývané také vrozené trombofilie, jsou charakteristické opakované tromboembolické příhody, objevující se bez zjevné příčiny před 45. rokem života, tromboembolické onemocnění v rodinné anamnéze a u žen anamnesticky obvykle zjišťujeme opakované potraty nebo předčasné porody.

4.4.1 Mutace FV - Leiden

Dahlbäck a kol. popsali v roce 1993 tzv. rezistenci na aktivovaný protein C (APC-R), jejíž příčina bývá většinou v bodové mutaci FV (Penka a kol., 2001). Roku 1995 skupina v čele s profesorem Bertinou učinila zásadní objev bodové mutace v genu pro koagulační faktor V. Tato mutace byla detekována u více než 90 % jedinců s laboratorními projevy rezistence na aktivovaný protein C. Podle místa objevu byla nazvána leidskou a mutovaný protein byl nazván FV Leiden (Redakce Zdravotnických novin, 2000).

Leidská mutace v genu pro faktor V je nejběžnější genetickou predispozicí k trombózám. V průběhu života je riziko tromboembolické příhody mezi nosiči této mutace 30 % a dále významně stoupá, pokud dojde k přidružení jiné získané nebo vrozené koagulopatie (např. antifosfolipidový syndrom nebo deficit proteinu C). Leidská mutace

je způsobena mutací v genu pro koagulační faktor V lokalizovaném na chromozomu 1q23, který kóduje klíčový enzym hemostázy, proakcelerin (Dahlbäck et al., 1993; Bertina et al., 1994). Mutace je bodová, na pozici 1691 v exonu 10 dochází k záměně baze guaninu za adenin (FV G1691A). Následkem této nukleotidové substituce je substituce aminokyseliny argininu (Arg = R) za glutamin (Gln = Q) v peptidickém řetězci na místě 506 (FV R506Q). To zapříčiňuje rezistenci faktoru V k antikoagulační aktivitě APC (aktivovaný protein C), tzv. APC rezistence (Legnani et al., 1996; Kapiotis et al., 1996).

Protein C je přirozený inhibitor koagulační kaskády, působí jako antikoagulant v krevní koagulační kaskádě a v plasmě se vyskytuje jako neaktivní prekurzor. Na povrchu endotelu cév působí trombin navázaný na trombomodulin změnu proteinu C v jeho aktivovaný stav (APC). APC je poté schopen, spolu s proteinem S, inaktivovat koagulační faktor V a VIII. Tímto mechanismem je bržděna nadměrná tvorba trombinu. Takto je inhibována celá koagulační kaskáda. Přirozeným inhibitorem aktivovaného faktoru V je aktivovaný protein C. Když je tedy díky mutaci faktor V rezistentní k APC, dochází tím k nerovnováze v koagulační kaskádě (Karetová, 2002).

Leidská mutace je mutace autozomálně intermediárně (neúplná dominance) dědičná. Každý člověk má ve svém genomu jednu kopii genu pro faktor V získanou od otce a druhou kopii tohoto genu od matky. Má-li tedy člověk ve svém genomu jednu kopii mutovanou (poškozenou) a druhou v pořádku, hovoříme o něm jako o heterozygotovi pro danou mutaci. Heterozygot má celoživotně 8krát zvýšené riziko žilní trombózy. Pokud od rodičů získá obě dvě kopie poškozené, jde o tzv. mutovaného homozygota pro danou mutaci. U takto postiženého člověka je riziko žilní trombózy celoživotně dokonce 80krát zvýšeno (Ridker et al., 1995).

Potvrdit tuto mutaci lze pouze molekulárně genetickým vyšetřením faktoru V (PCR vyšetření). Stanovení APC-R není specifické, neboť se lze setkat se získanou formou APC-R např. v těhotenství, při podávání orálních kontraceptiv atd. (Penka a kol., 2001). APC rezistence může být vyvolána i pouhým snížením hladiny faktoru V. Pokud se u jedné osoby setká snížená hladina faktoru V a zároveň heterozygocie FV Leiden je tento stav označován jako „pseudohomozygotní APC rezistence“. Frekvence mutované alely v genu pro faktor V byla v České republice u neselektované populace českých novorozenců stanovena na 5 %. Tato frekvence odpovídá evropskému etniku (Raušová a kol., 2005). Homozygoti FV Leiden se vyskytují 1 na 5000 obyvatel (Kvasnička, 2003).

Výskyt Leidenské mutace vykazuje zajímavou závislost na rase a zeměpisných faktorech. Nejčastěji byla prokázána u kavkazské populace severských zemí, především ve Skandinávii a v některých severských oblastech Německa byla tato mutace detekována až u 20 % běžné populace (Redakce Zdravotnických novin, 2000). Sršeň (2005) popisuje nejvyšší výskyt mutace FV Leiden ve Švédsku a postupně směrem na jih pokles výskytu, přičemž nejnižší výskyt je v Itálii a ve Španělsku. Penka (2001) uvádí, že prevalence této dominantně dědičné mutace faktoru V je v Evropě a Severní Americe u bílé rasy 3 – 15 % ve zdravé populaci a v ostatních částech světa se vyskytuje spíše výjimečně.

Tato mutace vykazuje zřetelný „founder effect“, což bylo zjištěno populačně genetickým výzkumem – vznikla asi před 30 až 40 tisíci lety u určitého „zakladatele“ bílého kavkazského původu a přinášela svým nositelům nějakou genetickou výhodu. Lze se např. domnívat, že vážná krvácející zranění, která vedla v severských podmínkách rychle k hemoragickému šoku, u nositelů této mutace méně krvácela, nebo že ztráty nosiček mutace při porodu byly mírnější. Mutace FV Leiden se v asijské a černošské populaci prakticky nevyskytuje (Redakce Zdravotnických novin, 2000).

V genu pro faktor V byly kromě mutace FV Leiden popsány také další mutace, které ale mají nízkou populační frekvenci. Mezi ně řadíme FV Cambridge, FV Hong Kong a FV HR2 haplotyp. Všechny tyto mutace vedou k mírné APC rezistenci. Faktor V Cambridge je bodová mutace v nukleotidu 1091 (G1091C), která vede k nahrazení argininu 306 threoninem (Arg306Thr). Haplotyp HR2 je rovněž bodová mutace v nukleotidu 4070 (A4070G), která způsobuje záměnu histidinu za arginin. Tato varianta vede k poklesu hladiny FV, pokud dojde ke snížení hladiny pod úroveň 0,2, dochází k manifestaci rezistence na aktivovaný FV, zejména omezením kofaktorové aktivity při štěpení aktivovaného FVIII. V asijské populaci se vyskytuje FV Hong Kong. V tomto případě dochází k záměnám argininu 306 za glycin (Arg306Gly) (Williamson et al., 1998; Chan et al., 1998; Faioni et al., 1999).

4.4.2 Mutace protrombinu

Protrombinová mutace v genu pro faktor II, protrombin lokalizovaný na chromozomu 11p11q12, byla identifikována Poortem v roce 1996 (Poort et al., 1996).

Příčinou zvýšených hladin protrombinu je zde záměna guaninu za adenin v poloze 20210 (G20210A) genu pro protrombin. Mutace se nachází ve 3' konci genu pro protrombin, v oblasti, která není přepisována do genu. Patří mezi gain-of-function mutace (mutace zisku funkce) zvyšující efektivitu štěpení pre-mRNA. Následně dochází k akumulaci mRNA a její translaci do podoby koagulačního proteinu (Gehring et al., 2001).

Tato mutace je autozomálně dominantně dědičná. Každý člověk má ve svém genomu jednu kopii genu pro faktor II získanou od matky a druhou kopii tohoto genu od otce. Je-li člověk heterozygotem nebo dokonce tzv. mutovaným homozygotem této mutace, má oproti zdravému zvýšené riziko rozvoje žilní trombózy.

Raušová (2005) ve své práci uvádí, že frekvence protrombinové mutace u náhodné skupiny českých novorozenců byla 1,5 % (Raušová et al., 2005). Sršeň (2005) popisuje výskyt této mutace často v rodinách spolu s mutací FV Leiden. Dále uvádí, že mutace protrombinového genu představuje 2 – 4krát větší riziko pro vznik hlubokých žilních trombóz a u pacientů s trombózou se vyskytuje 5 - 7,3 %. Jedná se o druhý nejčastější trombofilní stav. Protrombin je protein, závislý na vitamínu K, který je konvertován komplexem protrombinázy na trombin (Sršeň et al., 2005). Celkový výskyt heterozygotů s tímto polymorfismem je u Evropanů okolo 2 % (přičemž výskyt mutace je vyšší v jižní než v severní Evropě) a okolo 6 % u pacientů s první trombózou. Stejně jako u V. koagulačního faktoru je extrémně vzácná u Afričanů a Asiatů. Mutace protrombinu je rizikem nezávislým na přítomnosti mutace V. faktoru, nicméně současný výskyt obou zvyšuje riziko vzniku tromboembolické příhody. Heterozygotní konstituce mutace 20210 zvyšuje riziko trombotické příhody 2,8krát. Nebyla zjištěna souvislost mezi touto mutací a arteriálními trombózami (Poort et al., 1996; Karetová, 2002; Kupferminc et al., 1999).

4.4.3 Deficit proteinu C

V roce 1981 byla zjištěna Griffinem a spol. další příčina vrozené trombofilie – deficit proteinu C (Griffin et al., 1981). Protein C je vitamin K-dependentní plazmatický glykoprotein o molekulové hmotnosti 62 kDa, který se syntetizuje v játrech v inaktivní formě. Je aktivován trombinem na aktivovaný protein C (APC). Tento aktivovaný proces je 20 000krát silnější, pokud dojde k navázání trombinu na trombomodulin

na endoteliálních buňkách v malých cévách nebo jestliže je protein C navázán na endoteliální receptor proteinu C, který je přítomný hlavně ve velkých cévách, především v arteriích. APC inhibuje koagulační systém inaktivací faktoru VIIIa a Va prostřednictvím selektivního štěpení. Protein S je kofaktorem této reakce, která probíhá na fosfolipidovém povrchu. APC také hraje hlavní roli v sepsím díky utlumení funkce leukocytů a snížení zánětlivé reakce.

Gen, který kóduje protein C je lokalizován na chromozomu 2q13-q14 (zatím bylo popsáno cca 232 mutací v proteinu C). Dědičnost deficitu proteinu C je autozomálně dominantní. Heterozygotní forma deficitu proteinu C je spojena se zvýšeným rizikem žilní tromboembolie a povrchovou tromboflebitidou. V homozygotní formě může deficit proteinu C vyvolat u novorozenců purpuru fulminans, která je způsobena trombózou v malých cévách a ischemickou nekrózou kůže a podkoží (Turgeon, 2005; Tripodi et al., 1990).

Můžeme rozlišit 2 typy deficitu proteinu C. Typ I se vyznačuje sníženou hladinou proteinu C, zatímco u typu II je hladina proteinu normální, ale snížena je funkční aktivita – špatná interakce s kofaktory, chybná aktivace komplexu trombin-trombomodulin (Turgeon, 2005; Miletich et al., 1987).

Výskyt deficitu proteinu C je v populaci 0,2 - 0,4 % a u pacientů s trombózou okolo 3 %. Riziko vzniku trombózy u tohoto deficitu činí v průběhu života okolo 50 %, v těhotenství 3 - 10 % a v šestinedělí 7 - 19 %. Riziko intrauterinního úmrtí je u tohoto deficitu zvýšeno (Dahlbäck, 2000; Friedrich et al., 1996).

4.4.4 Deficit proteinu S

V roce 1984 byl popsán Schwarzem a spol. deficit proteinu S. Protein S je K-dependentní glykoprotein o molekulové hmotnosti 71 kDa (Comp et al., 1984). Tento glykoprotein má několik vlastností společných s proteinem C, neboť je také vitaminem K-dependentním a uplatňuje svoji inhibiční funkci společně s proteinem C. Volný protein S zvyšuje afinitu APC pro negativně nabitě fosfolipidové povrchy na endotelu nebo krevních destičkách a zhruba dvojnásobně zvyšuje účinnost štěpení faktorů Va a VIIIa aktivním proteinem C. Inhibice faktoru VIIIa však vyžaduje spoluúčast neaktivního

faktoru V, který působí jako kofaktor. 60 % proteinu S je navázáno na β -řetězec C4b-vazebného proteinu (C4bBP) a je proto inaktivní. Samotný protein S má, kromě své kofaktorové funkce, inhibiční aktivitu nezávislou na proteinu C. Inhibuje faktor Xa (tato reakce není ovlivněna vazbou na C4bBP) a váže se na faktory V a Va (ovlivněno vazbou na C4bBP). Pokud dojde k jeho navázání na faktor VIII, je schopen zpomalit aktivaci faktoru X. Protein C4bBP je ideálně tvořen 7 α podjednotkami a jednou β podjednotkou, která má vazebné místo pro protein S. Až 15 % cirkulujícího C4bBP podjednotku β nemá a vazby proteinu S se neúčastní. Hladina C4bBP má vliv zejména za patologických stavů organismu.

Protein S vzniká v játrech (za účasti vitamínu K), endoteliálních buňkách, megakaryocytech a Leydigových buňkách testes. Část proteinu S, která je syntetizována v megakaryocytech, je uložena v alfa granulích trombocytů a může při degranulaci destiček zvýšit lokální koncentraci volného proteinu S. Gen pro syntézu proteinu S je lokalizován na 3. chromozomu 3p11.1-3q11.2. Mutace jsou unikátní pro jednotlivé rodiny. Dosud bylo popsáno 157 mutací. Dědičnost deficitu proteinu S je autozomálně dominantní.

Deficity proteinu S můžeme rozdělit na 3 základní formy:

1. Typ I – pokles hladiny celkového i volného antigenu, pokles funkční aktivity.
2. Typ II – normální hladiny volného i celkového antigenu, pokles funkční aktivity – projeví se jako funkční deficit.
3. Typ III – snížena hladina volného antigenu, normální celkový antigen, pokles funkční aktivity - odpovídá stavu, kdy je zvýšena hladina C4bBP buď jako reakce na infekt, nebo jako vrozená porucha regulace jeho syntézy (McClatchey, 2002; Brenner et al., 2002; Beauchamp et al., 2004).

Deficit proteinu S se vyskytuje u běžné populace ve frekvenci 0,01 - 0,1 %, u pacientů s prodělanou hlubokou žilní trombózou je 2,3 - 4,6 % (Seligsohn et al., 2001). Fyziologicky klesá protein S v graviditě (asi o 30 %) a při užívání hormonální antikoncepce. Riziko rozvoje trombózy v těhotenství je až 6 %, v šestinedělí 7 - 22 %. Riziko intrauterinního úmrtí je u tohoto deficitu mírně zvýšeno (Preston et al., 1996; Friedrich et al., 1996). U těžkých forem preeklampsie byl popsán 16 % výskyt deficitu proteinu S. V homozygotní formě může tento deficit vyvolat u novorozenců neonatální purpuru fulminans a rozsáhlé nekrózy (Lockwood, 1999).

4.4.5 Deficit antitrombinu III

Antitrombin (antitrombin III) je jednořetězcový α -2-glykoprotein o molekulové váze 58 kDa, jehož syntéza probíhá především v játrech (k jeho syntéze není nutná přítomnost vitamínu K). AT je serin-proteázový inhibitor, který reguluje hlavně propagační a iniciační fázi koagulační kaskády a ireverzibilně blokuje aktivované faktory IXa, Xa, XIa, XIIa a trombin. Heparin tuto reakci zvyšuje asi 1000krát. Kromě heparinu zvyšují inaktivační aktivitu antitrombinu i glykosaminoglykany z endoteliálních buněk. Společně s trombinem antitrombin tvoří stabilní trombin-antitrombinový komplex (Kvasnička et al., 2003a; Brenner et al., 2002).

Nedostatek antitrombinu byl poprvé u pacienta popsán v roce 1965 Egerbergem (Egerberg, 1965). Jde o autozomálně dominantně dědičné onemocnění, které je způsobeno mutacemi v genu pro antitrombin, který je lokalizován na 1. chromozomu (q23 – 25). Výskyt deficitu AT v populaci je 0,02 %.

Tento vrozený defekt má tři typy (Kvasnička et al., 2003a; Lane et al., 1991; Mannucci et al., 1992):

Typ I – kvantitní nedostatek antitrombinu (nízká aktivita i hladina antigenu) – u tohoto typu není homozygotní forma slučitelná se životem. Heterozygotní forma je spojována s hlubokou žilní trombózou a plicním embolismem.

Typ II – kvalitativní nedostatek antitrombinu (nízká funkční aktivita, normální hladina antigenu) – tento typ rozdělujeme ještě do třech podtypů:

1. RS typ – dysfunkce antitrombinu v reaktivním místě (porucha schopnosti vázat aktivované faktory).
2. HBS typ – přítomna mutace, která negativně ovlivňuje vazbu antitrombinu s heparinem (dysfunkce vazby s heparinem).
3. PE typ – s mutací, která má pleiotropní efekt.

Typ III – chybí receptor pro heparin (nedostatečná odpověď na heparin).

Klinicky se tedy tento deficit projevuje hlavně trombózami hlubokých žil (převážně na dolních končetinách) a plicní embolií. Více než polovina pacientů s tímto deficitem má první trombózy již ve věku mezi 10 - 35 lety. Riziko trombózy se zvyšuje u žen ve spojení s těhotenstvím a antikoncepcí. V rámci vrozených koagulopatií mají pacienti s deficitem AT největší riziko vzniku trombózy.

Mnohem častější než vrozený deficit antitrombinu je deficit získaný, který se může vyskytovat u fyziologických stavů (těhotenství) nebo řady onemocnění (cirhóza jater, gastrointestinální choroby, sepse, nefrotický syndrom, pooperační stavy atd.) (Lane et al., 1991; Brenner et al., 2002; Olds et al., 1991).

4.4.6 Mutace v genu pro MTHFR

Enzym 5,10-methylenetetrahydrofolátreduktáza (MTHFR) má zásadní význam v metabolismu homocysteinu, neboť katalyzuje konverzi 5,10-methylenetetrahydrofolátu na 5-methyl-tetrahydrofolát, který je hlavní formou folátů v lidském organismu. Homocystein je neesenciální sirná aminokyselina vznikající v organismu člověka jako vedlejší produkt metabolismu esenciální kyseliny metioninu. K této přeměně dochází enzymatickým působením za přítomnosti vitaminů B₆, B₁₂ a kyseliny listové jako kofaktorů, které jsou nezbytné pro tento metabolismus. Homocystein v plazmě je obsažen v koncentraci přibližně 5 - 16 mol/l. Ze 70 % je homocystein v krvi vázán na albumin. Pokud metabolismus v buňce funguje normálně, vznikající homocystein se rychle přeměňuje v neškodné či dále zužitkované látky. Foláty jsou důležité pro mnoho metabolických pochodů včetně metylace homocysteinu, syntézy nukleotidů, neurotransmiterů proteinů a fosfolipidů. Změny v genu pro MTHFR proto mohou způsobit zvýšenou hladinu homocysteinu v krevní plazmě, tzv. hyperhomocysteinémií. Tu může ovšem způsobit i nedostatek vitaminů (kyseliny listové, B₆, B₁₂) nebo porucha jejich vstřebávání, nezdravý životní styl či menopauza (Penka a kol., 2001; Dekker et al., 1995; Goyette et al., 1994; Van der Put et al., 1998). Homocystein se vyznačuje vysokou chemickou aktivitou, která může při jeho hromadění v krvi přerůst až v agresivitu a toxicitu. Mutacemi v genu pro MTHFR vzniká enzym s vyšší termolabilitou, se sníženou aktivitou a vysokou hladinou homocysteinu v plazmě. Homocystein podporuje protrombotickou aktivitu ve stěně cév, což způsobuje vznik aterosklerózy a trombózy. Homocystein také působí cytotoxicky na endoteliální buňky, inhibuje buněčnou proliferaci a na endotelu inhibuje expresi trombomodulinu (tím i aktivaci proteinu C). Vysoká hladina homocysteinu (hyperhomocysteinémie) je také doprovázena zvýšením aktivity FV a FXII v krevní plazmě (Kvasnička et al., 2003a). Hyperhomocysteinémie tedy může být rizikovým faktorem pro žilní tromboembolismus, aterosklerózu, mozkovou mrtvici, infarkt

myokardu, plicní embolii, sklerotické a trombotické onemocnění periferních žil a defekty neurální trubice během prenatálního vývoje (Van der Put et al., 1998; Copp et al., 1990).

Bylo popsáno několik polymorfismů (polymorfismus je individuální odchylka v sekvenci DNA) a mutací v genu pro MTHFR snižující jeho aktivitu. Dva z nich mají závažné zdravotní důsledky - polymorfismus 677C/T a 1298A/C.

Mutace MTHFR C677T je substituce cytosinu (C) za tymin (T) v pozici 677 nukleotidového řetězce, která má za následek záměnu alaninu (ala) za aminokyselinu valin (val) v pozici 222 aminokyselinového řetězce (ala222val). Důsledkem této mutace je výrazný pokles katalytické aktivity enzymu. Nízká aktivita enzymu způsobuje defekt remethylace s následnou zvýšenou hladinu homocysteinu v krevním séru o 20 % a více, což je klasifikováno jako mírná, střední či těžká forma hyperhomocysteinemie.

Dědičnost této mutace je autozomálně recesivní. Výskyt heterozygotů v evropské, severoamerické a australské populaci je 31 % až 39 % a frekvence homozygotů 9 % až 15 %. Nositelé této mutace mají zvýšené riziko vzniku tromboembolické nemoci a kardiovaskulárních onemocnění. Riziko flebotrombózy je u nemocných ve srovnání se zdravou populací asi 10 – 50krát vyšší. U plodů může vyvolat tento polymorfismus defekty neurální trubice a v těhotenství spontánní aborty. Plody homozygotních matek mají relativní riziko vzniku defektů neurální trubice zvýšené asi 2krát oproti plodům matek s normálním genotypem (Frosst et al., 1995; De Stefano et al., 2000; Dekker et al., 1995; Van der Put et al., 1998).

Mutace MTHFR A1298C je způsobena substitucí adeninu (A) za cytosin (C) v pozici 1298 nukleotidového řetězce, která způsobuje záměnu glutamátu (glu) za alaninový zbytek (ala) v pozici 429 aminokyselinového řetězce (glu429ala). Přítomností této mutace klesá katalytická aktivita MTHFR, ale nedochází ke zvýšení hladiny homocysteinu v krevním séru. Tento polymorfismus je stejně jako MTHFR C677T považován za trombofilní faktor (Van der Put et al., 1998).

Kombinace hyperhomocysteinemie a mutace Leiden velmi výrazně zvyšuje riziko žilní trombózy a to asi 20krát (Mandel et al., 1996).

4.4.7 Nedostatek faktoru XII

První případ nedostatku faktoru XII byl identifikován v roce 1955 na osobě pana Hagemana, při rutinních předoperačních testech. Od té doby bylo popsáno několik set dalších osob s nedostatkem tohoto faktoru.

Koagulační faktor XII (faktor Hageman) je sialoglykoprotein vznikající v játrech. K jeho aktivaci dochází při poškození cév. Faktor XII byl původně považován za aktivátor faktoru XI. Pozdější důkazy ukazují, že faktor XI je aktivován trombinem, ale aktivace faktorem XIIa nebylo úplně vyloučeno. Faktor XII může být důležitý při zánětlivých procesech nebo jiných obranných mechanismech a hraje menší roli při koagulaci. U tohoto deficitu se předpokládá častější výskyt spontánních potratů.

Deficit faktoru XII je autozomálně recesivně dědičný. Heterozygoté mají hladinu faktoru XII na úrovni 40 – 60 % normálu. Gen faktoru XII se nachází na chromozomu 5 (Malý, 2004; Loscalzo et al., 2003).

4.4.8 Zvýšená hladina faktoru VIII

Faktor VIII je plasmatický glykoprotein o molekulové hmotnosti 360 kDa. Molekula FVIII je složena ze dvou řetězců – těžkého o molekulové hmotnosti 90 – 200 kDa a z lehkého o hmotnost do 80 kDa. Gen pro jeho syntézu je umístěn na chromozomu X. Patří mezi neenzymatické koagulační kofaktory, stejně jako FV. Faktor VIII koluje v plazmě nekovalentně vázaný na Von Willebrandův faktor (vWF). vWF má ochránit FVIII před předčasnou proteolytickou degradací. Pokud dojde ke kontaktu s trombinem, tato vazba se uvolní a tím vznikne vazebné místo pro fosfolipidy. FVIII je kofaktorem FIX a usnadňuje přeměnu FX na faktor Xa.

Zvýšení hladiny FVIII nad 150 % normálu se objevuje asi u 10 % populace. Je provázeno zvýšeným rizikem vzniku flebotrombózy (asi 6krát). Hladina FVIII také závisí na skupinovém systému AB0. Jedinci s krevní skupinou 0 mají nižší hladiny FVIII a proto i nižší riziko trombózy (Perry et al., 1999; Koster et al., 1995).

4.4.9 Zvýšená hladina inhibitoru aktivátoru plazminogenu PAI-1

Inhibitor aktivátoru plazminogenu je základním inhibitorem tkáňového plazminogenového aktivátoru (tPA) a urokinázy (uPA), aktivátorů plazminogenu a tedy fibrinolýzy. Gen pro lidský PAI-1 je lokalizován na chromozomu 7 v oblasti q21.3 – 22.

V promotoru genu, jenž kóduje PAI-1, se vyskytuje polymorfismus známý jako 4G/5G s tím, že alela 5G je méně transkripčně aktivní než alela 4G. Polymorfismus 4G je spojen s výraznější a rychlejší odpovědí na indukci genové exprese. Vysoké hladiny PAI-1 mohou doprovázet hyperkoagulační příhody jak ve venózní, tak i v arteriální oblasti, ale není jednoznačně dokázáno, že vysoká aktivita PAI-1 nebo 4G polymorfismus představují nezávislé rizikové faktory manifestace hyperkoagulace. Většinou jsou spojeny s dalšími riziky, mezi které patří: obezita, diabetes mellitus, hypertenze, kouření, operační zákroky, maligní onemocnění atd. Zvýšenou hladinu lze také pozorovat v oblasti kardiovaskulárních onemocnění. U pacientů s chirurgickými zákroky v oblasti ortopedii či onkologie představuje zvýšená hladina PAI-1 výrazné přídavné trombofilní riziko (Penka a kol., 2001; Becker, 1997).

4.5 Trombofilní stavy a těhotenství

Gravidita je sama o sobě hyperkoagulačním stavem a považuje se za rizikový faktor trombofilie. Oproti netěhotným ženám stejného věku je riziko hluboké žilní trombózy u těhotných žen až šestinásobné.

Vlivem působení těhotenských hormonů (především estrogenů) dochází ke zvýšení fibrinogenu a dalších koagulačních faktorů – FVII, FVIII, FIX a FX. Faktory II, V a XII jsou zvýšeny jen mírně, nebo zůstávají beze změny a koncentrace faktorů XI a XIII se snižuje. Hladina fibrinogenu se zvyšuje již v prvním trimestru a v průběhu třetího trimestru je koncentrace již o 50 % vyšší než před těhotenstvím. Dále k trombofilii v těhotenství přispívá i pokles celkového i volného proteinu S, druhotná rezistence vůči aktivovanému proteinu C a zvýšení hladiny inhibitorů fibrinolýzy. Hladina antitrombinu III se nemění. Protrombinový, trombinový a aktivovaný parciální tromboplastinový čas jsou mírně zkráceny, krvácivost a srážlivost zůstávají nezměněny. Předpokládá se, že uvedené změny

představují přirozenou ochranu organismu ženy, omezující riziko krvácení po porodu placenty. Hladiny koagulačních faktorů se normalizují 2 týdny po porodu (Hájek, 2004; Maiello et al., 2006).

Řada studií se v současné době zabývá vztahem trombofilie a závažných komplikací během těhotenství – opakované potrácení, předčasný porod, intrauterinní úmrtí plodu, růstová retardace plodu včetně nitroděložní smrti plodu a preeklampsie. Tyto komplikace mají velký podíl na celkové neonatální morbiditě a mortalitě. Riziko vzniku porodnických komplikací vzhledem k trombofilním mutacím se liší u jednotlivých populací (Procházka, 2004; Procházka, 2003).

Během těhotenství nastávají fyziologické změny (vazodilatace, zvýšení cévní kapacity), které zpomalují tok krve. K vyššímu výskytu hluboké žilní trombózy během těhotenství také přispívá zvětšující se tlak dělohy, sepse, šestinedělí a pokročilý věk matky. Také placenta může vykazovat trombotické projevy, které se manifestují ve formě placentárních infarktů (většinou způsobeny při vrozené poruše koagulace plodu), nekróz a placentární insuficience s projevy chronické tísně plodu (Procházka, 1999; Arias et al., 1998). Při deficitu proteinu C a S v homozygotní formě u plodu může dojít k úmrtí plodu již v druhém trimestru. Na straně matky jsou většinou potíže způsobeny kombinací libovolného trombofilního stavu s mutací genu pro MTHFR. Také mutace FV Leiden a mutace protrombinu G20210A představují zvýšené riziko potratů (Brenner et al., 2000).

4.6 Trombofilní stavy a perorální kontraceptiva

Hormonální antikoncepci užívá po celém světě několik desítek milionů žen. Přesto, že dnes již existují kontraceptiva s nízkým obsahem estrogenů, riziko žilního tromboembolizmu stále trvá. Jelikož venózní tromboembolizmus je onemocnění multifaktoriální, riziko jeho rozvoje je tedy vyšší u žen s trombofilním stavem (trombofilní mutací), ale ne u všech trombofilních stavů stejné. Předpokládá se, že vlivem estrogenů se zvyšují hladiny prokoagulačních faktorů, včetně inhibitorů fibrinolýzy. Kontraceptiva mohou navodit rezistenci k aktivovanému proteinu C i S, při jejich užití jsou popsány i snížené hladiny antitrombinu III. Obecně je riziko trombózy u žen užívajících perorální

kontraceptiva 4krát vyšší. Trombózy se nejčastěji objevují již v prvním roce užívání perorální antikoncepce!

U žen s heterozygotní formou mutace Leiden a užívajících hormonální antikoncepci je riziko žilního tromboembolizmu až 35krát vyšší než u žen bez této mutace a bez užívání antikoncepce. Toto riziko je samozřejmě ještě vyšší u homozygotní formy mutace Leiden (Godet et al, 1995; Vanderbroucke et al, 1999).

U žen majících protrombinovou mutaci a užívajících hormonální antikoncepci je riziko žilního tromboembolizmu zvýšeno 16krát, zatímco u žen s touto mutací neužívajících hormonální antikoncepci je riziko vyšší 6krát.

Riziko venózního tromboembolizmu u žen, které mají deficit antitrombinu III, proteinu C a S a které užívají hormonální antikoncepci, je obtížné vyčíslit vzhledem k menší frekvenci výskytu. U těchto trombofilních stavů je většinou hormonální antikoncepce kontraindikována, stejně jako u homozygotní formy faktoru V Leiden (Dulíček et al, 2002).

4.7 Trombofilní stavy u dětí

Hemokoagulace u dětí má svá specifika. Schopnost plasmy generovat trombin je u dětí snížena a zpožděna oproti plasmě u dospělých. U novorozenců je tato schopnost snížena až o 50 %, u kojenců a starších dětí je tento rozdíl kolem 25 % oproti plasmě dospělých lidí. U dětí je také zvýšena inhibice trombinu alfa-2 makroglobulinem. Tyto fyziologické mechanismy jsou příčinou velmi nízké incidence trombózy u dětí, ale i v dětském věku lze nalézt období s vyšším rizikem tromboembolických událostí. Za rizikové období je považováno období novorozenecké a adolescentní.

Lokalizace trombóz u dětí je také odlišná od dospělých. Až 80 % trombóz u novorozenců a 40 % všech dětí obecně je lokalizováno v povodí horní duté žíly.

Mezi vrozená trombofilní rizika řadíme u dětí především deficit antitrombinu, Leidenskou mutaci a protrombinovou mutaci.

Prevalence heterozygotní formy deficitu antitrombinu se pohybuje okolo 1 : 250 a až 50 % jedinců prodělá nějakou formu tromboembolické choroby do doby středního věku. V 67 % k této události dojde do 35 let věku pacienta. U homozygotní formy deficitu

antitrombinu je riziko ještě podstatně vyšší a k prvním projevům dochází již před desátým rokem věku dítěte.

Mutace faktoru II protrombinu se jako riziková projevuje především u adolescentů. U malých dětí je hladina faktoru II fyziologicky nižší, a proto není přítomnost protrombinové mutace sama o sobě spojována se zvýšeným rizikem tromboembolické choroby.

Hladina proteinu C je u dětí fyziologicky nízká (to platí především pro kojence do 6 měsíců). I později zůstávají hladiny proteinu C u dětí nižší a to kolem 40 % normy dospělých, proto u dětí není prokazatelná souvislost mezi deficitem proteinu C a vyšším rizikem tromboembolické choroby. U většiny jedinců s tímto deficitem se projeví riziko TEN až po patnáctém roce života. Co se týče homozygotní formy tohoto deficitu, tak je velmi vzácná, avšak život ohrožující již v novorozeneckém věku (bývá nejčastěji spojována s projevy purpury fulminans).

Děti s deficitem proteinu S v heterozygotní formě většinou TEN netrpí. U novorozenců je protein S přítomen jen ve volné formě, jelikož vazebný protein C4B není u novorozenců v plazmě přítomen. Tímto způsobem je kompenzována relativně nižší plazmatická hladina celkového proteinu S u novorozenců a malých dětí (Blatný, 2006).

5 MATERIÁL

5.1 Soubor probandů

Do studie klinického významu trombofilních mutací bylo celkem zařazeno 300 lidí s trombofilními mutacemi, kteří byli vyšetřeni v letech 2008 – leden 2010, tj. 169 probandů s nalezenými trombofilními mutacemi a 131 rodinných příslušníků, u nichž byly rovněž nalezeny trombofilní mutace.

107 probandů + 101 rodinných příslušníků bylo vyšetřeno v Praze a 62 probandů + 30 rodinných příslušníků v Liberci. Celkem se jedná o 206 žen ve věku 5 - 81 let a 94 mužů ve věku 5 – 75 let. Věková struktura probandů je uvedena v tabulce č. 2 a znázorněna v grafu č. 1. Nejčastěji se jednalo o pacienty ve věku 21 – 30 let a 31 – 40 let.

61 pacientů souhlasilo s vyšetřením celé rodiny. Bylo vyšetřeno 131 rodinných příslušníků. Většinou se jednalo o otce, matku a jejich děti, případně o rodinné příslušníky druhé generace. Celkem se jednalo o 38 otců majících trombofilní mutace, 45 matek majících trombofilní mutace, 74 jejich potomků s trombofilními mutacemi a 35 rodinných příslušníků druhé generace. U zbytku pacientů (tj. 108) nebyli vyšetřeni členové rodiny, protože se nemohli nebo nechtěli dostavit na odběr krve, nebo členové rodin nejsou započítáni do tohoto výzkumu, neboť neměli žádnou trombofilní mutaci.

S pacienty, u kterých se potvrdila trombofilní mutace, byla provedena genetická konzultace a sestaven rodokmen. V rodokmenu jsem se především zaměřovala na častý výskyt plicních embolií, infarktů myokardu, cévních mozkových příhod, spontánních abortů, varixů a dalších onemocnění, která by mohla s trombofilními mutacemi souviset.

Rodokmenové studie a odběry krve byly provedeny v genetické ambulanci při Ambulantním centru v Praze 3 – Olšanská 7. Vyšetření krve pacientů zajišťovala Laboratoř lékařské genetiky GENvia s.r.o. v Nemocnici sv. Alžběty, Na Slupi 6, Praha 2. Část pacientů (92 pacientů) byla vyšetřena v Krajské nemocnici Liberec, a.s., Husova ulice 10, Liberec 1. Všichni pacienti jsou české národnosti.

Situace, kdy lze předpokládat možnou trombofilii mutačního spektra (indikace k vyšetření trombofilních mutací):

1. V oblasti gynekologie – Pokud se u pacientky či v rodině vyskytují opakované spontánní aborty časně na základě placentárních infarktů. Vyšetřena musí být nejen

matky, ale i otce, jelikož mutace může být zděděna od matky, otce nebo od obou rodičů.

2. V oblasti interních, včetně metabolických a revmatologických onemocnění – Hypertenzní nemoc, opakované centrální mozkové příhody v rodokmenu, zejména ve středním věku, stejně tak infarkty myokardu či cévní příhody jiného druhu, např. tromboembolické pooperační stavy (např. embolie plic).
3. V oblasti výskytu vrozených vývojových vad typu rozštěpu neurální trubice.

Diagnózy, kvůli kterým byli pacienti testováni na trombofilní mutace, jsou uvedeny v tabulce č. 3.

5.2 Přístrojová technika a pomůcky

centrifuga Mikro 200 Hettich

eppendorfký

mikrocentrifuga E-Centrifuge Wealtec

pipety, špičky

termocycler LightCycler od firmy Roche

vortex Bio Vortex V1-Biosan

zkumavky

5.3 Chemikálie, reaktanty, kity

ethanol

High Pure PCR Template Kit

K3EDTA

LightMix = směs primerů pro MTHFR

master mix pro FII

master mix pro FV

mastermixu FastStart DNA Master HybProbe

primery, sondy

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Izolace lidské genomové DNA z plné nesrážlivé krve kitem High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE)

6.1.1 Požadavky na vzorek

Zpracována byla venózní nesrážlivá krev, která byla odebrána do zkumavky s K3EDTA (BD Vacutainer - fialový uzávěr) nebo jiné ekvivalentní. Vzorky krve je možné uchovávat při teplotě 2 - 8°C po dobu max. 8h (v případě dlouhodobého uchovávání zamrazit na -20°C nebo -80°C).

6.1.2 Princip metody

Kitem High Pure PCR Template Kit byla izolována genomová lidská DNA z plné nesrážlivé krve bez nutnosti separace leukocytů. Ve výchozím vzorku krve se nejprve lyzovaly erytrocyty a lyzát se poté separoval na QIAamp kolonkách. Genomová DNA byla adsorbována na membránu kolonky, několikrát promyta a poté eluována z membrány kolonky do roztoku.

6.1.3 Příprava setu

Proteináza K - lahvička 3, růžový uzávěr

- rozpustit v 4,5 ml dvakrát destilované vody
- rozdělit do 5 alikvotů po 900 µl a alikvoty zamrazit

Pufr na odstraňování inhibitoru (Inhibitor Removal Buffer) - lahvička 4a, černý uzávěr

- před prvním použitím přidat 20 ml ethanolu

Promývací pufr (Wash buffer) - lahvička 4, modrý uzávěr

- před prvním použitím přidat 80 ml ethanolu

6.1.4 Vlastní postup

1. Vytemperujeme vzorky krve na pokojovou teplotu (15 - 25°C) a důkladně promícháme.
2. Předehřejeme termoblok na 70°C.
3. Necháme roztát zamraženou proteázu.
4. Do 1,5ml zkumavky napipetujeme postupně:
 - 200 µl plné nesražené krve
 - 200 µl vazebního pufru (Binding Buffer) – zelený uzávěr
 - 40 µl proteinázy K
5. Ihned promícháme a inkubujeme při 70°C 10 minut.
6. Stočíme krátce v mikrocentrifuze (2 sekundy).
7. Přidáme 100 µl lizopropanolu a důkladně promícháme a stočí krátce v mikrocentrifuze (2 sekundy).
8. Přepipetujeme vše do kolonky vložené do sběrné zkumavky a centrifugujeme 1 min. při 8000 x g. Umístíme kolonku do nové sběrné zkumavky (WT). Použitou sběrnou zkumavku s filtrátem vyhodíme.
9. Do kolonky napipetujeme 500 µl pufru na odstraňování inhibitorů.
10. Stočíme v centrifuze 1 min. při 8000 x g. Použitou sběrnou zkumavku s filtrátem vyhodíme. Umístíme kolonku do nové sběrné zkumavky.
11. Do kolonky napipetujeme 500 µl promývacího pufru.
12. Stočíme v centrifuze 1 min. při 8000 x g. Použitou sběrnou zkumavku s filtrátem vyhodíme. Umístíme kolonku do nové sběrné zkumavky.
13. Do kolonky napipetujeme 500 µl promývacího pufru.
14. Stočíme v centrifuze 1 min. při 8000 x g. Použitou sběrnou zkumavku s filtrátem vyhodíme. Umístíme kolonku do nové sběrné zkumavky.
15. Centrifugujeme kolonku 10 sekund při 20000 x g, aby došlo k vysušení membrány kolonky (vynechání této centrifugace, při níž dochází k vysušení kolonky, může vést

k inhibici následného testu). Sběrnou zkumavku vyhodíme. Umístíme kolonku do klasické eppendorfky, přidáme 200 µl elučního pufru a vyčkáme 1 min.

16. Stočíme v centrifuze 1 min. při 8000 x g. Uzavřenou mikrozskumavku s eluátem uložíme do lednice pro vlastní analýzu, nebo zamrazíme na -20°C.

6.2 Detekce a genotypizace jednobodové mutace G1691A lidského genu pro FV (Leidenská mutace) a mutace G20210A genu pro FII (protrombin)

Fragment genu pro faktor V i II je amplifikován metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) za použití specifických primerů. Amplikony jsou detekovány prostřednictvím fluorescence specifických hybridizačních sond. Emitovaná fluorescence je změřena přístrojem LightCycler.

Hybridizační sondy slouží i ke genotypizaci a to vyhodnocením křivky tání. Je-li přítomna mutace, neshoda specifické sondy s cílovou DNA způsobuje sníženou stabilitu hybridu, takže dochází k poklesu fluorescence již při nižších teplotách. U přirozeného typu genotypu k neshodě nedochází, a proto heterogenní dvoušroubovice má vyšší stabilitu a tím i teplotu tání. Heterozygotní genotyp vykazuje charakteristickou kombinaci obou předchozích.

6.2.1 Amplifikace metodou PCR

Amplifikuje se fragment genu pro faktor V o délce 222 bp a fragment genu pro faktor II o délce 165 bp z DNA lidského genomu za použití specifických primerů.

Na přístroji LightCycler zadáme na programové obrazovce specifické nastavení pro soupravu faktor V nebo pro faktor II.

6.2.1.1 Příprava mastermixu a amplifikace

1. Rozmrazíme součásti soupravy faktor V nebo pro FII (přemístíme soupravu cca na 1 hod. do lednice), důkladně promícháme, stočíme v mikrocentrifuze minimálně 5 sekund a po rozmražení je skladujeme ve vychlazeném bloku.

2. Připravíme master mix:

počet reakcí = počet pacientů + 3 (negativní, pozitivní kontrola + jedna reakce navíc)

Do zkumavky o objemu 1,5 ml přidáme následující složky v pořadí uvedeném níže:

Pro FV Leiden

Pracovní roztoky:	Objem / na reakci	Objem / na reakci - ½ objem
FVL DIL, nádobka 4	11 µl	5,5 µl
FVL MD Mix, nádobka 1	2 µl	1 µl
FVL R Mix, nádobka 2	2 µl	1 µl
Celkový objem:	15 µl	7,5 µl

Pro FII

Pracovní roztoky:	Objem / na reakci	Objem / na reakci - ½ objem
FIIG20210A DIL, nádobka 4	11 µl	5,5 µl
FIIG20210A MD Mix, nádobka 1	2 µl	1 µl
FIIG20210A R Mix, nádobka 2	2 µl	1 µl
Celkový objem:	15 µl	7,5 µl

3. Opatrně promícháme výsledný mix.
4. Umístíme kapiláry do vychlazeného adaptéru.
5. Napipetujeme 15 µl (7,5 µl – ½ objem) master mixu do každé LightCycler kapiláry.
6. Do kapiláry v pozici 1 přidáme 5 µl (2,5 µl – ½ objem) negativní kontroly nádobka 4.
7. Do kapiláry v pozici 2 přidáme 5 µl (2,5 µl – ½ objem) pozitivní kontroly nádobka 3.
8. Do kapiláry v pozici 3 a výše přidáme 5 µl (2,5 µl – ½ objem) izolované DNA pacienta.
9. Navlékneme na každou kapiláru zátku.
10. Stočíme kapiláry umístěné v centrifugačních adaptérech (800 x g, 30 s).

11. Umístíme kapiláru obsahující negativní kontrolu do pozice 1 a kapiláru s pozitivní kontrolou do pozice 2.
12. Počínaje pozicí 3 umístíme do kotouče kapiláry se vzorky DNA pacientů.
13. Přeneseme kotouč do LightCycleru.
14. Amplifikace probíhá v termocykleru značky LightCycler od firmy Roche.

6.2.1.2 Real-time PCR analýza využívající FRET sondy

Pro stanovení mutace FV Leiden a FII byla použita technologie využívající hybridizační FRET (fluorescence resonance energy transfer) sondy. Alelově specifická oligonukleotidová sonda, která hybridizuje s mutovanou sekvencí, je značena fluoresceinem. Mutovaná a normální alela se od sebe liší různou křivkou tání a intenzitou fluorescenčního záření (Lay et al., 1997).

Primery FV:

FVL for 5' TAATCTGTAAGAGCAGATCC 3'

FVL rev 5' TGTTATCACACTGGTGCTAA 3'

Sonda FV:

FVL (Flu) 5' AATACCTGTATTTCCTCGCCTGTC 3'-Flu

Primery FII:

FII for 5' TAT TCT GGG CTC CTG GAA CCA ATC C 3'

FII rev 5' CCA GAG AGC AGC TGC CCA TGA ATA GCA 3'

Sonda FII:

FII (Flu) 5' FAM-GAC TCT CAG CAA GCC TC-DQ 3'

Pomocí výsledných vrcholů na křivce tání lze rozlišit homozygotní genotyp (divoký nebo mutant) a heterozygotní genotyp.

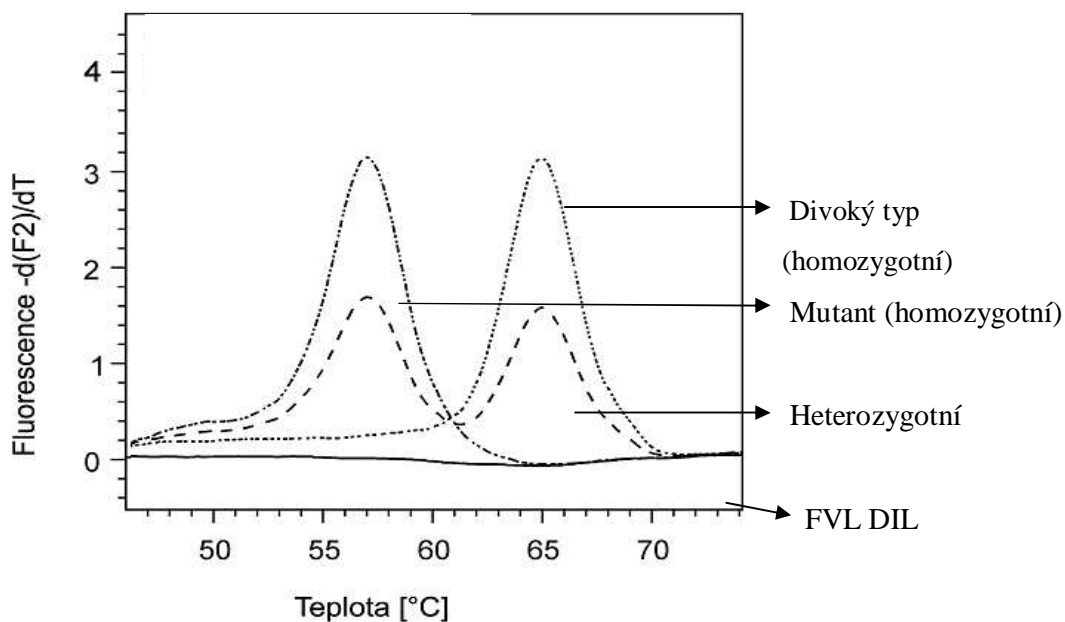
Pro FV Leiden

Templát DNA obsahuje	počet vrcholů tání	T _M vrcholu tání	ΔT mezi vrcholy
homozygotní přirozený genotyp	1	65°C	-
heterozygotní genotyp	2	57°C a 65°C	8°C
homozygotní mutantní genotyp	1	57°C	-

Pro FII

Templát DNA obsahuje	počet vrcholů tání	T _M vrcholu tání	ΔT mezi vrcholy
homozygotní přirozený genotyp	1	59°C	-
heterozygotní genotyp	2	49°C a 59°C	10°C
homozygotní mutantní genotyp	1	49°C	-

Teplota tání má odchylku $\pm 2,5^\circ\text{C}$, ΔT mezi vrcholy je $8^\circ\text{C} \pm 1,5^\circ\text{C}$.



Obr. 6 Vrcholy tání pro faktor V Leiden nám ukazují, že homologická sekvence (divoký genotyp) má hodnotu T_M vyšší, než sekvence s mutantním genotypem. Vzorky obsahující obě sekvence (heterozygotní genotyp) vykazují dva vrcholy při naprosto stejných teplotách jako vzorky homozygotní. Jako negativní kontrola byla DNA templátu nahrazena FVL DIL.

6.3 Detekce a genotypizace jednobodových mutací C677T a A1298C lidského genu pro 5,10-methylenetetrahydrofolát reduktázu (MTHFR)

Fragmenty genu pro MTHFR jsou amplifikovány metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) za použití specifických primerů. Amplikony jsou detekovány prostřednictvím fluorescence specifických hybridizačních sond. Emitovaná fluorescence je změřena přístrojem LightCycler.

6.3.1 Amplifikace metodou PCR

Při detekci C677T amplifikujeme fragment genu pro MTHFR o délce 332 bp z DNA lidského genomu za použití specifických primerů. Při detekci A1298C amplifikujeme fragment genu pro MTHFR o délce 163 bp.

Na přístroji LightCycler zadáme na programové obrazovce specifické nastavení pro soupravy MTHFR C677T a MTHFR A1298C.

a) Příprava mastermixu FastStart DNA Master HybProbe

1. Necháme pomalu roztát jednu nádobku „Reaction Mix“ – nádobka s bezbarvým víčkem označená 1b.
2. Po roztátí stočíme v miktocentrifuze společně s jednou nádobkou „Enzyme“ – nádobka s červeným víčkem označená 1a – ta se musí uchovávat pouze v -20°C, je ji možné centrifugovat při pokojové teplotě max. 5 sekund.
3. Z jedné bílé nádobky 1b přepipetuj 60 µl do jedné ze tří nádobek 1a a mírně promícháme repipetováním pipetou.
4. Přeznačíme nádobku 1a na 1 – to už je připravený mastermix pro PCR.

b) Příprava LightMixu

LightMix je směs primerů a sond, která je dodávána v lyofilizované podobě.

1. **Stočíme zkumavku** s LightMixem v mikrocentrifuze (tím se zajistí, aby se veškerý pelet obsahující sondy a primery dostal na dno zkumavky).

2. **Napipetujeme 66 µl vody** (PCR grade) a promícháme repipetováním špičkou; výsledný roztok krátce stočíme v mikrocentrifuze a zamrazíme na -20°C.

c) Příprava reakční směsi

1. Rozmrazíme součásti soupravy (přemístíme nádobky 3 – vodu a 2 – chlorid hořečnatý cca na 30 minut do lednice), důkladně promícháme, stočíme v mikrocentrifuze min. 5 sekund a po rozmražení je skladujeme ve vychlazeném bloku.
2. Umístíme jednu kapiláru na každý vzorek + dvě navíc (pro negativní a pozitivní kontrolu) do předchlazených adaptérů.
3. Připravíme master mix - do zkumavky napipetujeme postupně:
počet reakcí = počet pacientů + 3 (negativní, pozitivní kontrola + jedna reakce navíc)

Pro MTHFR C677T i MTHFR A1298C

Pracovní roztoky:	Objem / na reakci	Objem / na reakci - ½ objem
Voda – nádobka 3	7,4 µl	3,7 µl
MgCl ₂ – nádobka 2	1,6 µl	0,8 µl
Mix primerů	4 µl	2 µl
Připravený MasterMix - 1	2 µl	1 µl
Celkový objem:	15 µl	7,5 µl

4. Stočíme připravený mix v mikrocentrifuze. Před vlastním pipetováním mix opatrně promícháme.
5. Umístíme kapiláry do vychlazeného adaptéru.
6. Napipetuj 15 µl (7,5 µl – ½ objem) master mixu do každé LightCycler kapiláry.
7. Do kapiláry v pozici 1 přidáme 5 µl (2,5 µl – ½ objem) negativní kontroly – voda.
8. Do kapiláry v pozici 2 přidáme 5 µl (2,5 µl – ½ objem) pozitivní kontroly.
9. Do kapiláry v pozici 3 a výše přidáme 5 µl (2,5 µl – ½ objem) izolované DNA pacienta.
10. Navlékní na každou kapiláru zátku a stočíme kapiláry umístěné v centrifugačních adaptérech.

11. Umístíme kapiláru obsahující negativní kontrolu do pozice 1 a kapiláru s pozitivní kontrolou do pozice 2. Počínaje pozicí 3 umístíme do kotouče kapiláry se vzorky DNA pacientů a přeneseme kotouč do LightCycleru.

d) Amplifikace

Amplifikace probíhá v termocykleru značky LightCycler od firmy Roche.

6.3.2 Real-time PCR analýza využívající FRET sondy

Komplementární cílové úseky DNA pro sondy jsou v blízkosti z důvodu nutného kontaktu 5'- konce a 3'- konce druhé sondy, aby mohl být uskutečněn rezonanční přenos energie. Oba sousedící konce sond jsou značeny barvivý, akceptorem je LC Red a donorem je fluorescein. Snímač detekčního přístroje registruje intenzitu fluorescenčního záření a hodnotí křivku tání. Negativní derivace je pak zobrazena jako peak, který specificky určuje teplotu tání (Nakamura et al., 2002).

Primery:

MTHFR 677F	5'- CGA AGC AGG GAG CTT TGA GGC TG – 3'
MTHFR 677R	5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG – 3'
MTHFR 1298F	5'- CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C – 3'
MTHFR 1298R	5'- CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG – 3'

Sondy:

MTHRF 677 (Flu)	5'- TGA CCT GAA GCA CTT GAA GGA GAA GGT GTC – 3'- Flu
MTHFR 677 (LC)	5'- LC Red 640 – CGG GAG CCG ATT TCA TCA T – 3'- PHO
MTHFR 1298 (Flu)	5'- AAG GAG GAG CTG CTG AAG ATG TGG GGG GAG GAG CT – 3'- Flu
MTHFR 1298 (LC)	5'- LC Red 705 – ACC AGT GAA GAA AGT GTC TTT GA – 3'- PHO

Pomocí výsledných vrcholů na křivce tání lze rozlišit homozygotní genotyp (divoký nebo mutant) a heterozygotní genotyp.

MTHFR C677T

Templát DNA obsahuje	počet vrcholů tání	T _M vrcholu tání	ΔT mezi vrcholy
homozygotní přirozený genotyp	1	63,3°C	-
heterozygotní genotyp	2	63,3°C a 55,0°C	8,3°C
homozygotní mutantní genotyp	1	55,0°C	-

MTHFR A1298C

Templát DNA obsahuje	počet vrcholů tání	T _M vrcholu tání	ΔT mezi vrcholy
homozygotní přirozený genotyp	1	65°C	-
heterozygotní genotyp	2	59°C a 65°C	6°C
homozygotní mutantní genotyp	1	59°C	-

6.4 Statistické hodnocení

Pro určení zda vzorek dat odpovídá předpokládanému rozložení nebo se nějak liší, jsem použila chí-kvadrát test (χ^2). Chí-kvadrát testem vypočítaná hodnota se pak srovná s kritickou hodnotou odpovídající zvolené hladině významnosti (5 %) při daném počtu stupňů volnosti.

7 VÝSLEDKY

Do tohoto výzkumu bylo celkem zařazeno 300 lidí s trombofilními mutacemi, kteří byli vyšetřeni v letech 2007 – 2010. Celkem se jedná o 206 žen ve věku 5 - 69 let a 94 mužů ve věku 5 – 68 let.

Největší výtěžnost v souladu s populačními studiemi je v oblasti mutací MTHFR (MTHFR C677T i MTHFR A1298C) - 266 (88,6 %) pozitivních nálezů v oblasti mutací MTHFR alespoň v jednom z mutačních míst v heterozygotním stavu nebo v homozygotním stavu, včetně složených heterozygotů v obou mutačních místech.

Menší výtěžnost je v oblasti sledování mutací faktoru V Leiden a mutace faktoru II protrombinu.

U 99 pacientů byly zjištěny vícečetné (dvě a více) trombofilní mutace.

Mutace MTHFR C677T byla nalezena u 162 pacientů, což činí 54 % z celkového počtu pacientů. Z toho 33 pacientů je homozygotními nositeli této mutace a 129 pacientů je nositeli heterozygotní formy mutace. U 84 pacientů (28 % z celkového počtu pacientů) byla zjištěna jen mutace MTHFR C677T a žádná jiná trombofilní mutace. Z tohoto počtu bylo 26 pacientů nositeli homozygotní formy a 58 pacientů nositeli heterozygotní formy této mutace. Ve 46 případech (15,3 % z celkového počtu pacientů) byla zachycena u jednoho pacienta současně jak mutace MTHFR C677T tak i mutace MTHFR A1298C – obě v heterozygotním stavu. 20 pacientů (6,7 % z celkového počtu pacientů) mělo pozitivní nález pro mutaci MTHFR C677T a mutaci faktoru V Leiden současně. Z toho ve 14 případech šlo o heterozygotní formu u obou mutací, v 5 případech byla zjištěna mutace MTHFR C677T v homozygotní formě spolu s mutací Leiden ve formě heterozygotní a u jednoho pacienta byla nalezena mutace MTHFR C677T v heterozygotní formě s mutací faktoru V Leiden ve formě homozygotní. U 3 pacientů byla objevena kombinace mutace MTHFR C677T a protrombinové mutace G20210A (FII), z čehož se 2krát jednalo o heterozygoty v obou mutacích a 1krát byla mutace MTHFR C677T v homozygotním stavu spolu s mutací FII ve stavu heterozygotním. Mutace MTHFR C677T současně s mutací MTHFR A1298C a mutací Leiden, všechny v heterozygotním stavu, byla zjištěna u 3 pacientů. 1 pacient měl mutaci MTHFR C677T, MTHFR A1298C a protrombinovou mutaci G20210A, všechny v heterozygotním stavu. Ve 2 případech byla nalezena mutace MTHFR C677T společně s mutací Leiden a protrombinovou mutací, z toho byly

u 1 pacienta všechny v heterozygotním stavu a u druhého pacienta byla mutace MTHFR C677T v homozygotním stavu a ostatní v heterozygotním. Všechny mutace, tj. MTHFR C677T, MTHFR A1298C, Leiden a FII, byly zaznamenány u 3 pacientů a všechny byly v heterozygotním stavu.

Trombofilní mutace MTHFR A1298C byla diagnostikována u 157 pacientů. Z toho šlo ve 120 případech o heterozygotní a ve 37 případech o homozygotní formu této mutace. U 84 pacientů (28 % z celkového počtu pacientů) byla zjištěna jen mutace MTHFR A1298C a žádná jiná trombofilní mutace. Dále byla u 46 pacientů zachycena tato mutace spolu s mutací MTHFR C677T (viz. text výše). 16 pacientů mělo jak mutaci MTHFR A1298C, tak i mutaci faktoru V Leiden – v 8 případech šlo o dvojitého heterozygota pro dané mutace, ve 3 případech byla mutace MTHFR A1298C v heterozygotním stavu a mutace Leiden ve stavu homozygotním a v 5 případech se vyskytovala mutace MTHFR A1298C ve stavu homozygotním a mutace Leiden ve stavu heterozygotním. Pouze jeden pacient měl kombinaci mutace MTHFR A1298C a protrombinové mutace, obě v heterozygotním stavu. U 1 pacienta byla objevena kombinace 3 mutací a to mutace MTHFR C677T, MTHFR A1298C a protrombinové mutace, všechny byly v heterozygotním stavu. Mutace MTHFR A1298C současně s mutací MTHFR C677T a mutací Leiden, všechny v heterozygotním stavu, byla zjištěna u 3 pacientů (viz. text výše). Kombinace mutace MTHFR A1298C, mutace Leiden a mutace faktoru II (protrombinu) byla zachycena celkem 3krát. 2krát šlo o homozygota pro mutaci MTHFR A1298C a dvojitého heterozygota pro zbylé dvě mutace a 1krát byly všechny 3 mutace v heterozygotním stavu.

Dále bylo zachyceno celkem 76 pozitivních nálezů mutace faktoru V Leiden, většinou v kombinaci s nějakou další trombofilní mutací. Celkově se jednalo o 71 heterozygotů pro tuto mutaci a 5 homozygotů. U 28 pacientů (9,3 % z celkového počtu pacientů) byla zjištěna jen mutace Leiden a žádná jiná trombofilní mutace. Z tohoto počtu bylo 27 pacientů nositeli heterozygotní formy této mutace a 1 pacient byl homozygotem mutace Leiden. Mutace Leiden byla u pacientů zjištěna i v kombinaci s jinou trombofilní mutací – nejčastěji v kombinaci s mutací MTHFR C677T nebo s mutací MTHFR A1298C (viz. text výše). U 1 pacienta byla objevena mutace Leiden spolu s protrombinovou mutací G20210A, obě byly v heterozygotním stavu.

Nejmenší výtěžnost měla protrombinová mutace G20210A, která byla zachycena u celkem 19 pacientů a vždy v heterozygotním stavu. Žádný homozygot této mutace

zachycen nebyl. U 5 pacientů (1,7 % z celkového počtu pacientů) byla zjištěna jen mutace FII (protrombinu) a žádná jiná trombofilní mutace. U zbylých 14 případů se tato mutace vyskytovala ještě v kombinaci s nějakou jinou trombofilní mutací (viz. text výše).

Výsledky jsou shrnuty v tabulkách číslo 4a, 4b a 4c a grafech číslo 2a a 2b.

7.1 Klinické konsekvence u pacientů majících trombofilní mutace

U každého pacienta, u kterého byla zjištěna trombofilní mutace, byly zaznamenány všechny klinické konsekvence, které se vztahují k trombofilním mutacím. U některých pacientů se vyskytovalo více komplikací, proto jsou do tabulky započítáni vícekrát, např.: žena prodělala infarkt myokardu a flebotrombózu, je tedy započítána 1krát u pacientů, kteří prodělali infarkt myokardu a 1krát u pacientů, u nichž byla diagnostikována flebotrombóza.

Počet pacientů, kteří prodělali infarkt myokardu, je uveden odděleně od pacientů s ischemickou chorobou srdeční, neboť se jedná o jeden z nejčastějších projevů u pacientů s trombofilními mutacemi. Mezi pacienty s ischemickou chorobou srdeční jsou započítáni pacienti s jinými projevy, než je infarkt myokardu. Mezi tyto choroby srdeční řadíme např.: trombózu předsíně, aurikuly a komory, koronární trombózu nekončící infarktem myokardu, akutní ischemická nemoc (choroba) srdeční NS, chronickou ischemickou chorobu srdeční, ischemickou kardiomyopatii, němou ischemii myokardu, aneuryzma koronární tepny, atd.

7.1.1 Klinické konsekvence u pacientů s mutací MTHFR C677T

a) v heterozygotním stavu

V souboru pacientů s mutací MTHFR C677T v heterozygotním stavu ($n = 58$) se u 26 pacientů, což představuje 44,8 %, nevyskytly žádné komplikace (ani v jejich rodokmenu).

Infarkt myokardu prodělalo celkem 8 pacientů s touto mutací (tj. 13,8 %) a ti uvádějí, že infarkty myokardu prodělalo několik příbuzných v jejich rodokmenu. Cévní mozkovou příhodu (CMP) mělo celkem 7 pacientů (tj. 12 %). Ischemická choroba srdeční byla zjištěna u 5 pacientů (tj. 8,6 %). Flebotrombózu dolních končetin prodělali 3 pacienti (tj. 5,2 %) a trombózu (bez následné embolizace) 2 pacienti (tj. 3,4 %). 4 pacientky (tj. 6,9 %) měly problémy s varixy.

Z celkového počtu 29 žen, které v průběhu svého života byly těhotné nebo porodily, celkem 9 žen (tj. 31 %) prodělalo alespoň jeden spontánní abort. 2 ženy prodělaly spontánní abort 1krát, z toho jedné z těchto žen se poté narodilo dítě s vadou levé ruky a jedna žena nesnášela hormonální antikoncepci (HAK). U 6 žen došlo ke spontánnímu abortu 2krát, jedna z těchto žen poté porodila mrtvé dítě, u jedné z žen došlo k předčasnému porodu a u jedné z žen se přišlo na to, že potracený plod má těžké končetinové vady. Jedna žena spontánně potratila celkem 3krát. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 5.

b) v homozygotním stavu

V souboru pacientů s mutací MTHFR C677T v homozygotním stavu ($n = 26$) se u většiny pacientů vyskytly zdravotní komplikace spojené s touto mutací. Pouze u 2 pacientů (tj. 7,7 %) se neprojevyly žádné komplikace.

13 pacientů, což představuje 50 %, prodělalo během svého života CMP a více než polovina z těchto pacientů (tj. 7) prodělala CMP více než jedenkrát. U 3 pacientů s CMP se dostavily ještě jiné komplikace (většinou se jednalo o infarkt myokardu). Infarkt myokardu prodělalo celkem 7 pacientů (tj. 27 %) a většina těchto pacientů více než 2krát. Ischemická choroba srdeční (ICHS) představuje nedostatečné prokrvení části srdečního svalu (ischemii myokardu) v důsledku poruchy věnčitých tepen, které srdeční sval normálně vyživují. Tato choroba byla zjištěna celkem u 5 pacientů, což představuje 19,2 % pacientů z tohoto souboru. U 2 pacientek byla zjištěna trombóza dolní končetiny, u jedné již v 16 letech.

Z celkového počtu 21 žen, které v průběhu svého života byly těhotné nebo porodily, celkem 10 žen (tj. 47,6 %) alespoň jednou spontánně potratilo. 3 z těchto žen potratily 1krát, u jedné ženy byl potracený plod se spinou bifida (= rozštěp páteře - defekt vývoje neurální trubice způsobený neúplným uzavřením jednoho nebo více obratlů). Tato

žena sama měla spinu bifidu. 4 ženy spontánně potratily 2krát a 3 ženy 3krát. 2 pacienti (tj. 7,7 %) s touto mutací měli rozštěp. Jedna takto postižená měla cheilognatopalatoschisis, což je rozštěp rtu + čelisti + patra (její bratr má vrozenou vývojovou vadu) a druhý pacient měl rozštěp močové trubice (uvádí, že mají rozštěpy a vrozené vývojové vady v rodině). Všechny ženy s touto mutací snášely hormonální antikoncepci dobře. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 6.

7.1.2 Klinické konsekvence u pacientů s mutací MTHFR A1298C

a) v heterozygotním stavu

V souboru pacientů s mutací MTHFR A1298C v heterozygotním stavu ($n = 54$) se u 28 pacientů, což představuje 51,9 %, nevyskytly žádné komplikace spojené s touto mutací.

5 pacientů (tj. 9,3 %) prodělalo cévní mozkovou příhodu a ta se jen u jednoho z těchto pacientů opakovala vícekrát. ICHS byla zjištěna u 8 pacientů (tj. 14,8 %) s touto mutací a ti uvádějí, že se vyskytuje i v jejich rodokmenu. 8 pacientů (tj. 14,8 %) prodělalo infarkt myokardu, 2 z těchto pacientů ho měli opakovaně. K plicní embolii došlo u jednoho pacienta (tj. 1,8 %). Varixy se vyskytly u 4 pacientek, což představuje 7,4 % pacientů s touto mutací.

Z celkového počtu 23 žen, které v průběhu svého života byly těhotné nebo porodily, celkem 8 žen (tj. 34,8 %) alespoň jednou spontánně potratilo. U 3 žen došlo ke spontánnímu abortu jednou, jedna z těchto žen uvádí, že mají v rodině vrozené vývojové vady (hlavně končetin a malformace CNS), její bratr s VVV zemřel. 4 ženy spontánně potratily 2krát a jedna žena 3krát. Jeden pacient uvádí, že jeho dcera má hemodynamický defekt síňového septa. Všechny ženy s touto mutací snášely hormonální antikoncepci dobře, jen jedné se po ní objevily varixy. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 7.

b) v homozygotním stavu

V souboru pacientů s mutací MTHFR A1298C v homozygotním stavu ($n = 30$) se u 10 pacientů, což představuje 33,3 %, nevyskytly žádné komplikace spojené s touto mutací.

9 pacientů s touto mutací (tj. 30 %) prodělalo infarkt myokardu. Ischemická choroba srdeční byla zjištěna u jednoho pacienta (tj. 3,3 %). Cévní mozková příhoda se vyskytla u 4 pacientů a ti uvádějí, že ji měli i příbuzní. U jednoho pacienta (tj. 3,3 %) byla diagnostikována plicní embolie. Varixy se vyskytly u 2 pacientek (tj. 6,7 %), nikoli však po nasazení hormonální antikoncepce. Všechny pacientky s touto mutací snášely hormonální antikoncepci dobře.

Z celkového počtu 14 žen, které v průběhu svého života byly těhotné nebo porodily, celkem 9 žen (tj. 64 %) alespoň jednou spontánně potratilo. Jedna žena potratila spontánně 1krát, 7 žen 2krát a jedna žena 3krát. Většina těchto žen uvádí, že se spontánní aborty vyskytují i v jejich rodině. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 8.

7.1.3 Klinické konsekvence u pacientů s mutací Leiden nebo protrombinovou mutací

a) mutace Leiden

V souboru pacientů s mutací Leiden v heterozygotním a homozygotním stavu ($n = 27 + 1 = 28$) se u 11 pacientů, což představuje 39,3 %, nevyskytly žádné komplikace spojené s touto mutací.

Jedna pacientka z tohoto souboru měla mutaci Leiden v homozygotním stavu, tato pacientka prodělala flebotrombózu a plicní embolii, těhotenství u ní proběhl bez komplikací.

Flebotrombóza dolních končetin postihla 4 pacienty s touto mutací, což představuje 14,3 %. Žilní trombóza byla diagnostikována u 4 pacientů (tj. 14,3 %), u 2 z těchto pacientů došlo k následné plicní embolizaci. Jedna pacientka měla žilní trombózu po dlouhé cestě. 4 pacienti (tj. 14,3 %) prodělali infarkt myokardu (všichni jednou). U 5 pacientů (tj. 17,8 %) se vyskytla plicní embolie.

Z celkového počtu 17 žen, které v průběhu svého života byly těhotné nebo porodily, celkem 4 žen (tj. 23,5 %) alespoň jednou spontánně potratily. Jedna z těchto žen potratila jednou, 2 ženy 2krát a jedna z žen spontánně potratila 7krát. Hormonální antikoncepce nedělala pacientkám s touto mutací žádné problémy. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 9.

b) protrombinová mutace (FII)

Všichni pacienti, kteří měli protrombinovou mutaci, měli nějaké komplikace spojené s touto mutací. U všech pěti pacientů (tj. 100 %) se jednalo o žilní trombózu. 2 ženy s touto mutací normálně porodily, v těhotenství neměly žádné problémy a neprodělaly spontánní potrat. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 10.

7.1.4 Klinické konsekvence u pacientů s více trombofilními mutacemi současně

a) mutace MTHFR C677T a MTHFR A1298C současně

V souboru pacientů s mutacemi MTHFR A1298C a MTHFR C677T současně (n = 46) se u 19 pacientů, což představuje 41,3 %, nevyskytly žádné komplikace spojené s těmito mutacemi (jen jedna pacientka trpěla na častější hematomy).

Cévní mozkovou příhodu prodělalo celkem 9 pacientů (tj. 19,6 %) a 2 z nich uvádějí, že se vyskytuje v jejich rodokmenu, jeden pacient prodělal CMP opakovaně. U 6 pacientů (tj. 13 %) se vyskytla ischemická choroba srdeční. U 1 pacientky (tj. 2,1 %) byla diagnostikována flebotrombóza pravé dolní končetiny, tato pacientka trpí na časté luxace kyčlí. Infarkt myokardu prodělalo 9 pacientů (tj. 19,6 %), 3 z nich opakovaně a ve velmi nízkém věku. Plicní embolii měla jedna pacientka (tj. 2,1 %) s těmito mutacemi. Varixy se vyskytly u 3 pacientek (tj. 6,5 %), u jedné z nich po nasazení hormonální antikoncepce. Jinak pacientky s těmito mutacemi neměly problémy s užíváním hormonální antikoncepce. Jeden pacient (tj. 2,1 %) prodělal žilní trombózu.

Z celkového počtu 20 žen, které v průběhu svého života byly těhotné nebo porodily, celkem 6 žen (tj. 30 %) alespoň jednou spontánně potratilo. Jedna z těchto žen potratila 1krát, 4 ženy 2krát a jedna žena 3krát. Jedna z těchto žen uvádí, že mají v rodině vrozené vývojové vady a jedna žena uvádí, že mají v rodokmenu anomálie páteře. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 11.

b) mutace MTHFR C677T a Leiden současně

V souboru pacientů s mutacemi MTHFR C677T a Leiden současně ($n = 20$) se u 5 pacientů, což představuje 25 %, nevyskytly žádné komplikace spojené s těmito mutacemi.

3 příbuzní pacienti (tj. 15 %) měli aseptickou nekrosi kyčelního kloubu. Degenerativní onemocnění cévních stěn neboli ateroskleróza, bylo zjištěno celkem u 2 pacientů (tj. 10 %). Cévní mozkovou příhodu prodělali celkem 4 pacienti (tj. 20 %) a jeden z těchto pacientů 2krát. U 2 pacientů (tj. 10 %) byla diagnostikována ischemická choroba srdeční. Infarkt myokardu prodělali 2 pacienti (tj. 10 %), oba jedenkrát. Trombóza se vyskytla u 3 pacientů (tj. 15 %), u jednoho z těchto pacientů následně došlo k plicní embolii. 3 ženy (tj. 15 %) s těmito mutacemi měly varixy, ale u žádné nešlo o následek po nasazení hormonální antikoncepce.

Ženy s těmito mutacemi hormonální antikoncepci snášely dobře, bez jakýchkoli komplikací. Z celkového počtu 8 žen, které v průběhu svého života byly těhotné nebo porodily, 2 ženy (tj. 25 %) 2krát spontánně potratily. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 12.

c) mutace MTHFR A1298C a Leiden současně

V souboru pacientů s mutacemi MTHFR A1298C a Leiden současně ($n = 16$) se u 3 pacientů, což představuje 18,8 %, nevyskytly žádné komplikace spojené s těmito mutacemi.

Cévní mozkovou příhodu prodělalo 6 pacientů (tj. 37,5 %) s těmito mutacemi. Jeden pacient uvádí, že se CMP vyskytuje ve více generacích v jeho rodině. U 2 pacientů (tj. 12,5 %) se vyskytla ischemická choroba srdeční. Infarkt myokardu prodělalo celkem 5

pacientů (tj. 31,3 %), z toho jeden pacient opakovaně. K plicní embolii došlo u jednoho pacienta (tj. 6,3 %). U jednoho pacienta (tj. 6,3 %) byla diagnostikována stenóza aorty, která představuje překážku odtoku krve z levé komory a způsobuje koncentrickou hypertrofii levé komory a následně ischemii.

Z celkového počtu 6 žen, které v průběhu svého života byly těhotné nebo porodily, celkem 3 ženy (tj. 50 %) spontánně potratily. Jedna z těchto žen potratila 2krát a 2 ženy 3krát. Jedna žena uvádí, že se v jejich rodině vyskytují vrozené vývojové vady horních končetin. Ženy s těmito mutacemi neměly problémy s hormonální antikoncepcí. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 13.

d) mutace Leiden a FII současně

Tuto kombinaci mutací měla pouze jedna pacientka, která trpěla na varixy a prodělala jednu infarkt myokardu. Problémy s antikoncepcí neměla a gravidní nebyla.

e) mutace MTHFR C677T a FII současně

Tuto kombinaci mutací měli celkem 3 pacienti (muži). Všichni 3 pacienti (tj. 100 %) prodělali infarkt myokardu. Jeden z těchto pacientů 2krát. U jednoho pacienta byla zjištěna plicní embolie.

f) mutace MTHFR A1298C a FII současně

Kombinaci mutací MTHFR A1298C a protrombinové mutace (FII) měla jedna žena. U této ženy se vyskytly komplikace spojené s těmito mutacemi a to v podobě varixů. Jinak tato žena jedenkrát porodila a neprodělala žádný spontánní potrat.

g) mutace MTHFR C677T a MTHFR A1298C a Leiden současně

Kombinaci těchto mutací měli celkem 3 pacienti. Jeden z těchto pacientů neměl žádné problémy spojené s těmito mutacemi. U jedné pacientky se vyskytla ateroskleróza a jeden pacient měl trombózy dolních končetin. Pacientka neměla problémy s užíváním hormonální antikoncepce.

h) mutace MTHFR C677T a MTHFR A1298C a FII současně

Tuto kombinaci mutací měla pouze jedna pacientka. Tato žena prodělala žilní trombózu. Pacientka neměla v těhotenství žádné problémy a spontánní abort neprodělala.

i) mutace MTHFR C677T a Leiden a FII současně

Kombinaci těchto mutací měli celkem 2 pacienti (muž a žena). Oba prodělali plicní embolii. Muž prodělal masivní plicní embolii již ve 24 letech. Žena neměla žádné komplikace v těhotenství (porod 2krát) a nikdy spontánně neporodila.

j) mutace MTHFR A1298C a Leiden a FII současně

Tuto kombinaci trombofilních mutací měli celkem 3 pacienti. Žádný z nich nemá obtíže spojené s těmito mutacemi a všichni jakékoli potíže negují.

k) mutace MTHFR C677T a A1298C a Leiden a FII současně

Kombinaci těchto trombofilních mutací měli celkem 3 pacienti (2 muži a žena). Jeden pacient měl varixy, jakékoli další obtíže neguje. Vyšetřen byl v centru asistované reprodukce. U druhého pacienta se vyskytla flebotrombóza, jinak se s ničím neléčí a vše

neguje. Třetí pacientka prodělala ischemickou chorobu srdeční, jinak se s ničím neléčí. Sádru měla, ale bez TEN. Hormonální antikoncepci užívá bez jakýchkoli obtíží.

7.1.5 Souhrnný přehled klinických konsekvencí u pacientů s trombofilními mutacemi

V souboru pacientů s trombofilními mutacemi ($n = 300$) se u 109 pacientů, což představuje 36,3 %, nevyskytly žádné komplikace spojené s těmito mutacemi. Pacienti s mutací MTHFR A1298C v heterozygotním stavu měli nejméně obtíží a nejvyšší procento (51,9 %) těchto pacientů nemělo vůbec žádné obtíže.

Z celkového počtu 139 žen, které v průběhu svého života byly těhotné nebo porodily, celkem 51 žen s trombofilními mutacemi (tj. 36,7 %) spontánně potratilo. 11 žen potratilo jednou, 30 žen potratilo 2krát, 9 žen 3krát a jedna žena 7krát. Potratovost u žen s trombofilními mutacemi je znázorněna v grafu č. 3. Nejvyšší procento spontánních potratů bylo mezi ženami s trombofilní mutací MTHFR C677T v homozygotním stavu nebo s mutací MTHFR A1298C v homozygotním stavu a u žen, které mají mutaci Leiden či kombinaci těchto mutací. U těchto žen se vyskytly i VVV, mezi které patří spina bifida, rozštěp močové trubice a cheilognatopalatoschisis.

Aseptická nekrose kyčelního kloubu se vyskytla u 3 pacientů (tj. 1 %) s trombofilními mutacemi. Všichni tři pacienti měli mutaci MTHFR C677T a Leiden současně.

Ateroskleróza neboli degenerativní onemocnění cévních stěn byla zjištěna celkem u 3 pacientů (tj. 1 %), 2 z těchto pacientů měli kombinaci mutací MTHFR C677T a Leiden současně.

Cévní mozkovou příhodu prodělalo celkem 48 pacientů (tj. 16 %), někteří i opakovaně. Nejvyšší procento CMP bylo zjištěno u pacientů, kteří měli trombofilní mutaci MTHFR C677T v homozygotním stavu.

U 9 pacientů (tj. 3 %) byla diagnostikována flebotrombóza neboli zánět hlubokých žil dolních končetin se vznikem krevní sraženiny. 4 pacienti s flebotrombózou měli mutaci Leiden.

Ischemickou chorobu srdeční mělo celkem 30 pacientů, což představuje 10 % z celkového počtu pacientů. Nejvíce pacientů, u kterých byla diagnostikována ICHS, bylo mezi pacienty s mutací MTHFR C677T v homozygotním stavu.

56 pacientů (tj. 18,7 %) prodělalo infarkt myokardu. Někteří pacienti měli infarkt i vícekrát. Největší procento pacientů, kteří prodělali infarkt myokardu, bylo mezi pacienty mající mutaci MTHFR A1298C v homozygotním stavu a mezi pacienty mající mutaci MTHFR C677T v homozygotním stavu.

Plicní embolie se vyskytla u 13 pacientů, což představuje 4,3 % z celkového počtu pacientů. 5 z těchto pacientů byli nositeli mutace Leiden.

U jednoho pacienta (tj. 0,3 %) byla diagnostikována stenóza aorty. Tento pacient měl mutaci MTHFR A1298C a Leiden současně.

Trombóza se vyskytla u 19 pacientů (tj. 7,3 % z celkového počtu). Nejčastěji ji měli pacienti mající mutaci Leiden, mutaci MTHFR C677T a Leiden současně nebo protrombinovou mutaci.

19 pacientů, což představuje 7,3 % z celkového počtu pacientů, mělo varixy. Nejčastěji jimi trpěli pacienti mající mutaci MTHFR C677T v heterozygotním stavu, nebo mutaci MTHFR A1298C v heterozygotním stavu.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 14 a v grafu č. 4.

7.2 Srovnání klinických konsekvencí mezi heterozygoty a homozygoty trombofilních mutací

Porovnání heterozygotů a homozygotů bohužel u Leidenské mutace nemohu udělat, jelikož mám velmi málo homozygotů pro tuto mutaci.

Co se týče mutace MTHFR C677T, tak je u této mutace významně vyšší výskyt cévní mozkové příhody u homozygotů než u heterozygotů, $p = 0,0006$ což je statisticky vysoce signifikantní. Rozdíl mezi homozygoty a heterozygoty mutace MTHFR C677T je také u ischemické choroby srdeční, kde $p = 0,04$ a u spontánních abortů, kde $p = 0,03$.

U mutace MTHFR A1298C nebyly rozdíly mezi homozygoty a heterozygoty této mutace nijak statisticky významné.

Zajímavé je, že složení heterozygoti mutace MTHFR C677T + MTHFR A1298C mají stejný výskyt trombofilních komplikací jako heterozygoti jednotlivých mutací (buď mutace MTHFR C677T nebo MTHFR A1298C v heterozygotním stavu).

7.3 Spontánní aborty a trombofilní mutace

V mém souboru bylo vyšetřeno celkem 139 žen, které v průběhu svého života byly těhotné nebo porodily. Z toho počtu prodělalo 51 žen (což je 36,7 %) alespoň jeden spontánní potrat. Toto procento je velmi vysoké vzhledem k potratovosti v České republice. V běžné populaci dojde ročně ke 138 spontánním abortům na 100 000 obyvatel (viz. tabulka č. 15).

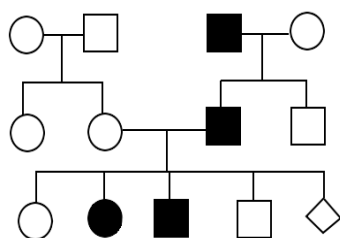
K nejvíce spontánním abortům došlo u žen, které měly mutaci MTHFR C677T v homozygotním stavu, nebo mutaci MTHFR A1298C v homozygotním stavu. Ženy s trombofilními mutacemi (hlavně v homozygotním stavu) mají také vyšší riziko předčasných porodů a poruch implantace embrya.

Jak je vidět na grafu č. 3, více jak třetina žen s trombofilními mutacemi prodělala alespoň jeden spontánní potrat. Většinou se však jednalo o dva spontánní potraty. Nejvyšší riziko potratů je u žen majících mutaci MTHFR C677T nebo mutaci MTHFR A1298C v homozygotním stavu a u žen, které mají mutaci Leiden či kombinaci těchto mutací.

7.4 Familiární výskyt a způsob dědění

- Mutace Leiden

Mutace Leiden byla zachycena v 18 kompletně (vyšetření matka + otec + potomci) vyšetřených rodinách. Bylo vyšetřeno celkem 18 matek, 18 otců a 32 potomků. Mutace Leiden byla předána na 25 potomků, což je 78 %, zbylých 7 potomků bylo negativních. Pouze ve 2 případech měli mutaci oba rodiče, jinak byla mutace děděna vždy od jednoho rodiče (11 matek a 13 otců mělo tuto mutaci). 16 potomkům byla předána mutace od otce (3 potomci tuto mutaci od otce nezdědili – byli negativní), 7 potomkům od matky



Obr. 6 Ukázka rodokmenu s autozomálně dominantním typem dědičnosti

všechno tedy svědčí pro autozomálně dominantní dědičnost, což znamená, že se uvedená mutace přenese prakticky do každé další generace. Pokud budou matka i otec heterozygoté této mutace, je 75 % pravděpodobnost přenosu této mutace do další generace (z toho ve 25 % případů se bude jednat o homozygota této mutace a v 50 % o heterozygota). 25 % potomků bude zdravo a bez mutace. Pokud ale bude jeden z rodičů homozygotem této mutace a druhý heterozygotem, je 100 % pravděpodobnost přenosu na potomky (z toho 50 % potomků bude homozygoty pro tuto mutaci a 50 % heterozygoty). Potomci jednoho heterozygota a zdravého jedince (bez mutace) budou z 50 % heterozygoty a z 50 % zdraví. Potomci homozygota a jedince bez mutace budou ve 100 % heterozygoty této mutace.

(4 potomci tuto mutaci od matky nezdědili – byli negativní) a 2 potomkům ji mohl předat jakýkoli z rodičů, jelikož oba rodiče měli mutaci Leiden. Žádnou čerstvou mutaci jsem nezaznamenala. Klinické konsekvence spojené s touto mutací se projeví jak u heterozygotů, tak i u homozygotů mutace Leiden. Toto

- Mutace protrombinu

Tato mutace byla zachycena u 5 kompletně vyšetřených rodin. Celkem bylo vyšetřeno 5 matek, 5 otců a 7 potomků (2 matky a 3 otcové měli mutaci). Mutace FII byla předána na 6 potomků, což je 86 %, jeden potomek byl negativní. 4 potomkům byla mutace předána od otce a 2 potomkům byla předána od matky (1 potomek tuto mutaci od matky nezdědil – byl negativní). Žádnou čerstvou mutaci jsem nezaznamenala. Klinické konsekvence spojené s touto mutací se projevují ve stejné míře jak u heterozygotů, tak i u homozygotů. Toto všechno tedy svědčí pro autozomálně dominantní dědičnost.

- Mutace MTHFR C677T

Mutace MTHFR C677T byla zachycena u 20 kompletně (vyšetření matka + otec + potomci) vyšetřených rodin. Bylo vyšetřeno celkem 20 matek (14 matek mělo tuto mutaci), 20 otců (14 otců mělo tuto mutaci) a 29 potomků. Mutace MTHFR C677T byla předána na 18 potomků, což činí 62 %, zbylých 11 potomků bylo negativních a tuto mutaci tedy nemělo. V 8 rodinách měli mutaci MTHFR C677T oba rodiče a přenesli tuto mutaci na 7 potomků (na 2 potomky se mutace nepřenesla). Jinak poměr přenosu od matek nebo otců byl 1 : 1. Žádnou čerstvou mutaci jsem nezaznamenala. Příznaky spojené s mutací MTHFR C677T se vyskytují u homozygotů i heterozygotů, ale u homozygotů jsou ale vyjádřeny daleko intenzivněji. Toto všechno tedy svědčí pro autozomálně neúplně dominantní způsob dědičnosti.

- Mutace MTHFR A1298C

Mutace MTHFR A1298C byla zachycena u 21 kompletně vyšetřených rodin (vyšetření matka + otec + potomci). Bylo vyšetřeno celkem 21 matek (2 byly homozygoty této mutace), 21 otců (3 byli homozygoty této mutace) a 29 potomků. 23 potomků (tj. 79 %) zdědilo mutaci MTHFR A1298C a 6 potomků ji nezdědilo. V 9 rodinách měli mutaci oba rodiče a ti mutaci přenesli na 10 svých potomků (5 potomků bylo homozygoty této mutace). Jinak byl poměr přenosu od otce nebo od matky 1 : 1. Žádnou čerstvou mutaci jsem nezaznamenala. Příznaky spojené s mutací MTHFR A1298C se vyskytují u homozygotů i heterozygotů, ale u homozygotů jsou ale vyjádřeny daleko intenzivněji. Toto všechno tedy svědčí pro autozomálně neúplně dominantní dědičnost.

V tabulce č. 16 je ukázka familiárního výskytu trombofilních mutací.

8 DISKUZE A SROVNÁNÍ S LITERATUROU

Trombofilie znamená zvýšenou dispozici k tvorbě trombů neboli krevních sraženin. Zdravotní komplikace vzniklé v důsledku zvýšené srážlivosti krve mohou být velmi vážné, například hluboká žilní trombóza, která je třetím nejčastějším kardiovaskulárním onemocněním (hned po infarktu myokardu a cévní mozkové příhodě), postihne v ČR ročně 15 000 – 20 000 lidí, z nichž přibližně 600 zemře na plicní embolii. Výskyt jednotlivých klinických konsekvencí u běžné populace podle ÚZIS (přepočteno na 100 000 obyvatel) je uveden v tabulce č. 15.

Výsledná individuální dispozice k srážlivosti krve a riziko vzniku trombotické události je výsledkem kombinace genetické výbavy, zdravotního stavu a aktuální životní situace. Informaci zakódovanou v DNA každého člověka sice již nelze změnit, lze ji ovšem účinně využít k prevenci nebo zmírnění závažných zdravotních komplikací v rizikových situacích.

Takovou situací může být nejen již probíhající trombotické onemocnění, ale také například počátek užívání antikoncepce, plánované těhotenství, porod, hormonální substituce v menopauze, příprava na umělé oplodnění, dlouhodobý let, imobilizace, operace a další.

Pozitivní stanovení trombofilních mutací pak znamená pro pacienta nutnost prevence trombózy v rizikových situacích po celý další život, např. průběh těhotenství nebo operace jsou v takovém případě pod zvýšenou kontrolou.

Penka (2001) udává, že je frekvence mutace Leiden v populaci 3 - 15 % a stále se zvyšuje. Homozygoti mutace Leiden jsou velmi vzácní. Seligsohn et al. (2001) ve své studii uvádí, že přítomnost FV Leidenské mutace je spojena se zvýšeným rizikem žilní trombózy a plicní embolie. Rosendaal et al. (1995) zjistil, že riziko žilní trombózy se velmi liší v závislosti na heterozygotním nebo homozygotním nosičství mutace. Zjistil 7 násobné riziko pro heterozygoty a až 79 násobné riziko pro homozygotní nosiče. De Stafano (2001) uvádí, že vliv na zvýšenou rekurenci žilní trombózy nebyl prokázán. Baranovskaya et al. (1998) našli statisticky významnou souvislost mezi infarkty myokardu a mutací Leiden (především u starších pacientů).

V mém souboru pacientů jsem zachytila celkem 28 lidí s mutací Leiden (bohužel jen jeden člověk ji měl v homozygotním stavu) a 48 lidí, kteří měli mutaci Leiden a

nějakou další mutaci. Jelikož v mém souboru pacientů mám jen velmi málo homozygotů této mutace, nedokáži posoudit, jak se liší rizika výskytu klinických konsekvencí mezi homozygotem a heterozygotem této mutace. Mohu ale říci, že lidé s mutací Leiden, mají nejvyšší riziko výskytu trombózy nebo flebotrombózy během života ve srovnání s lidmi, kteří mají nějakou jinou trombofilní mutaci nebo žádnou trombofilní mutaci. Mutace Leiden také představuje velmi vysoké riziko vzniku plicní embolie. Vliv hormonální antikoncepce u žen majících tuto mutaci jsem nezaznamenala. Prevence je tedy extrémně důležitá, ale ne vždy ji lze zajistit. Leidenská mutace se totiž sama o sobě nemusí projevovat prakticky nijak. Jakmile má člověk zjištěnou Leidenskou mutaci, měl by tuto skutečnost lékařům hlásit, a to zejména před plánovanými operacemi, v těhotenství i před porodem.

Má práce tedy potvrzuje výsledky předchozích studií. Je důležité ale vědět, že se jedná sice o časté onemocnění, ale velký vliv na vzniku jakéhokoli klinického příznaku má i prostředí, věk, obezita, kouření, strava, těhotenství, antikoncepce a jiné trombofilní stavy. Je tedy možné, že se v jednotlivých výzkumech budou výsledky lišit a to v závislosti na zvolené skupině (věk, těhotenství, malignita, atd.).

Co se týče dědičnosti této mutace, setkáváme se ve studiích s různými názory. Midwifery (2004) ve své studii tvrdí, že je tato mutace děděna autozomálně dominantním způsobem. Ridker (1995) ve své publikaci uvádí autozomálně intermediální (neboli neúplně dominantní) způsob dědičnosti. V mém souboru pacientů jsem měla 18 kompletně vyšetřených rodin, které měli mutaci Leiden. Mutace Leiden se přenesla na 78 % potomků. Závažně komplikace spojené s touto mutací měli heterozygoti i homozygoti pro tuto mutaci. Toto svědčí pro autozomálně dominantní typ dědičnosti.

Výskyt mutace faktoru II (FII) protrombinu je v populaci podle literatury (Sršeň, 2005) 5 – 7,3 %. Pihusch (2001) uvádí, že protrombinová mutace je rizikovým faktorem pro spontánní aborty zvláště v prvním trimestru gravidity. V mém souboru pacientů jsem bohužel neměla ani jednu ženu, která byla těhotná a měla protrombinovou mutaci. Samama (2003) uvádí, že riziko žilní trombózy se výrazně zvyšuje u žen v graviditě a po porodu. Riziko stoupá ještě 3krát v přítomnosti dalšího častého rizikového faktoru, kterým je FV Leiden. Casas (2004) ve své studii uvádí, že vztah k zvýšenému riziku arteriální trombózy nebyl jednoznačně prokázán. Na velké skupině 3 028 pacientů prokázal statisticky významný vztah mutace a ischemické mozkové příhody (odds ratio 1,44). Gehring (2001)

ve své publikaci píše, že není prokázáno, že homozygotní nosiči mutace mají vyšší hladinu protrombinu než heterozygotní.

V mém souboru pacientů mělo protrombinovou mutaci celkem 19 pacientů. Většina pacientů s touto mutací měla ještě nějakou jinou trombofilní mutaci. Pouze u 5 pacientů byla zjištěna jen tato mutace a všech 5 pacientů prodělalo trombózu. Lidé nesoucí protrombinovou mutaci mají zvýšené riziko rozvoje tromboembolické nemoci - dochází u nich ke zvýšené krevní srážlivosti a vzniku trombů. Krevní sraženiny tvořící se při TEN jsou schopné se uvolnit z místa svého vzniku a putovat cévami krevního řečiště. Pokud není trombóza včas léčena, dochází až u 25 % případů k plicní embolii, kdy krevní sraženiny putují krevním řečištěm k plicním tepnám, ty se mohou ucpat a to v mnoha případech vede až k zástavě srdce. U pacientů, kteří měli tuto mutaci, se téměř vždy vyskytly nějaké komplikace spojené s touto mutací. 7 pacientů prodělalo trombózu, 3 pacienti plicní embolii (hlavně pacienti s mutacemi Leiden, FII a MTHFR C677T současně), 4 pacienti infarkt myokardu a u 3 se vyskytly varixy. Je zajímavé, že všichni 3 pacienti mající mutace MTHFR A1298C a Leiden a FII současně neměli žádné komplikace. Je tedy vidět, že pacienti mající tuto mutaci, mají závažné komplikace spojené s touto mutací a riziko TEN je u nich velmi vysoké. Pro potvrzení všech výše uvedených tvrzení by bylo třeba mít daleko větší vzorek pacientů s protrombinovou mutací, což je složité, jelikož tuto mutaci má jen 5 % populace.

U pacientů s protrombinovou mutací je velmi důležitá prevence a znalost dědičných vloh. Pacient, který zná své dědičné dispozice, způsobující vyšší rizika tromboembolických onemocnění, může preventivně přizpůsobit svou životosprávu a vyhnout se tak dalším rizikům a faktorům přispívajícím ke vzniku trombózy.

Ma et al. v roce 2000 ve své studii tvrdí, že jednoznačně neprokázaly zvýšené riziko akutního IM pro jedince s prokázanou mutací MTHFR C677T.

Žák (2004) ve své studii píše, že hladinu homocysteinu lze snížit podáváním vitaminů B12, B6 a kyseliny listové. Tato cílená terapie u pacientů s ICHS se zvýšenou hladinou homocysteinu může zpomalit progresi koronární aterosklerózy. Dosud ale nejsou k dispozici data z prospektivních studií, která by prokázala, že tato terapie vede i ke snížení mortality u pacientů s ICHS.

Goracy et al. provedli v roce 1999 v Polsku studii, jejíž cílem bylo odhadnout četnost rozdělení polymorfismu MTHFR C677T u pacientů, kteří prodělali v minulosti IM

a vyhodnotit vztah mezi tímto polymorfismem a věkem počátku IM. Studie byla provedena u 100 pacientů ve věku IM 34 až 76 let. Výsledky jejich studie naznačují, že C677T polymorfismu genu MTHFR není rizikovým faktorem pro infarkt myokardu u polské populace.

Adams et al. (1996) provedl studii s 532 subjekty (310 pacientů s infarktem myokardu a 222 obyvatel-kontrol). Nenašli rozdíl v distribuci genotypu MTHFR ($p = 0,57$) nebo frekvenci alel ($p = 0,68$) mezi pacienty s infarktem myokardu a kontrolami. Dospěli tedy k závěru, že mutace MTHFR není hlavním rizikovým faktorem pro infarkt myokardu.

Ve studii Den Heijera et al. z roku 2005 se uvádí, že mutace MTHFR C677T má spojitost se vznikem trombózy.

V mém souboru pacientů jsem zachytila celkem 162 pacientů s mutací MTHFR C677T a 157 pacientů s mutací MTHFR A1298C. Jen mutaci MTHFR C677T a žádnou jinou mělo celkem 84 pacientů (z toho 26 pacientů v homozygotním stavu). Mutaci MTHFR A1298C a žádnou jinou mělo celkem 84 pacientů (z toho 30 pacientů v homozygotním stavu). Obě mutace MTHFR mělo celkem 46 pacientů. U mutace MTHFR C677T jsem zaznamenala významně vyšší výskyt cévní mozkové příhody u homozygotů než u heterozygotů. 13,8 % pacientů majících mutaci MTHFR C677T v heterozygotním stavu prodělalo IM. 50 % pacientů s mutací MTHFR C677T v homozygotním stavu mělo CMP. Nejčastější klinická konsekvence u pacientů s mutací MTHFR A1298C byla ICHS a IM, u pacientů s mutací MTHFR A1298C v homozygotním stavu to byl IM.

Zajímavé je, že složení heterozygoti mutace MTHFR C677T + MTHFR A1298C mají stejný výskyt trombofilních komplikací jako heterozygoti jednotlivých mutací (buď mutace MTHFR C677T nebo MTHFR A1298C v heterozygotním stavu). Nejčastější klinická konsekvence u těchto pacientů byla CMP a IM.

Z výzkumů tedy plyne, že pacienti mající mutace MTHFR mají větší sklon k IM a CMP. Hůře jsou na tom pacienti mající mutace MTHFR v homozygotním stavu.

V literatuře se většinou uvádí (např. Rosenblatt et al., 1977), že dědičnost těchto mutací je autozomálně recesivní. V mém souboru pacientů s mutacemi MTHFR měli potíže i heterozygoté (je ale třeba vzít v úvahu, že projev tromboembolismu závisí i na dalších faktorech), což svědčí pro autozomálně neúplně dominantní dědičnost, kdy mají potíže více homozygoti a méně heterozygoti.

8.1 Potraty

Potratovost u žen s trombofilními mutacemi není malá. Jak je vidět v tabulce číslo 14, 51 žen s trombofilními mutacemi ze 139 žen, které někdy v průběhu svého života byly těhotné nebo porodily, prodělalo alespoň jeden spontánní abort. 40 žen, což činí 29 %, dokonce prodělalo dva a více spontánní aborty. To je velmi vysoké procento. V ČR dojde ročně ke 138 spontánním abortům na 100 000 obyvatel.

Viděla bych tu hned dva problémy. Prvním je fakt, že nosičství 2 trombofilních mutací v homozygotním stavu je letální, což znamená, že dojde k potratu. Je tedy potřeba otestovat na trombofilní mutace nejen ženu, ale i jejího partnera. Pokud má žena např. mutace MTHFR C677T v homozygotním stavu a mutaci Leiden v heterozygotním stavu a její partner má mutaci MTHFR C677T v heterozygotním stavu a mutaci Leiden ve stavu homozygotním, nastane tu velký problém, jelikož může docházet k přenosu obou mutací v homozygotním stavu, což je letální. Tento pár tedy bude mít problém s početím. Druhým problémem je fakt, že pokud má matka nějakou trombofilní mutaci, např. mutaci MTHFR C677T v homozygotním stavu, může docházet ke spontánním abortům nebo odumření plodu z důvodu trombóz v cévách placenty, placentárních infarktů či placentární insuficience nebo v důsledku vzniku vývojových vad (anencefalie, spina bifida atd.), které ne vždy jsou slučitelné se životem.

Jelikož způsob dědičnosti některých trombofilních mutací je autozomálně dominantní, viděla bych problém spontánních abortů a trombofilních mutací jako dosti závažný.

Behjati et al. (2006) zkoumali výskyt trombofilních mutací u íránských žen. V souboru bylo 36 žen s nejasnou příčinou infertility, 65 žen s opakovanými spontánními potraty a 62 zdravých fertálních žen (kontrola). Leidenská mutace byla objevena u 11 (30,6 %) infertálních žen, u 13 žen (20 %) s opakovanými aborty a u žádné ženy z kontrolní skupiny. Byl tedy nalezen statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a oběma skupinami dysfertálních žen. Mutace v genu pro MTHFR (C667T) byla nalezena u 18 (50 %) infertálních žen, u 41 žen (63,1 %) s opakovanými potraty a u 24 (38,7 %) fertálních žen. Spojitost byla potvrzena mezi mutací C667T a opakovanými potraty a nebyla potvrzena mezi touto mutací a neplodností. Jedna infertální žena (2,8 %), 3 (4,6 %) s opakovanými potraty a 2 ženy (3,2 %) z kontrolní skupiny měly mutaci v genu pro

protrombin. Ani u jedné ze studovaných skupin nebyla nalezena spojitost mezi mutací v genu pro protrombin a daným problémem.

Výskyt Leidenské mutace a mutace G20210A zkoumali Finan et al. (2002) u 110 libanonských žen s opakovanými potraty a u 67 plodných žen (kontrola). 45 žen (40,1 %) s opakovanými potraty neslo Leidenskou mutaci, přičemž 38 bylo heterozygotek a 7 homozygotek, mezi kontrolními ženami bylo 11 heterozygotek (16,4 %) pro Leidenskou mutaci. Mutace v genu pro protrombin byla zaznamenána u 15 žen (13,6 %) s opakovanými potraty a u 2 žen (3 %) bez problémů. Mezi výskytem obou dvou mutací ve studované a kontrolní skupině byl zaznamenán statisticky významný rozdíl a potvrzena spojitost mezi nimi a opakovanými aborty.

V mém souboru 51 pacientek se spontánními aborty nevyšly rozdíly mezi trombofilními mutacemi nějak statisticky významně. Je to dáno zřejmě tím, že byl otestován příliš malý vzorek pacientek. U pacientek s mutací MTHFR A1298C v homozygotním stavu potratilo spontánně celkem 64 % pacientek ($n = 14$), což je velmi vysoké procento. Pacientky s mutací MTHFR C677T v homozygotním stavu spontánně potratily ve 47,6 % ($n = 21$). U těchto pacientek byl také zaznamenán výskyt rozštěpových vad. Byly otestovány 2 pacienti s rozštěpem a 2 se spinou bifidou a u všech byla nalezena mutace MTHFR C677T v homozygotním stavu. Bohužel by se musel otestovat daleko větší počet pacientů s rozštěpovými vadami (hlavně rozštěpy páteře), aby se dalo říci, že to má spojitost s mutací MTHFR C677T v homozygotním stavu.

Pacientkám, u nichž byla nalezena některá z trombofilních mutací, bylo doporučeno podrobné vyšetření a sledování na hematologii a navrženo i vyšetření blízkých příbuzných. U žen s mutacemi může individuálně volená terapie kyselinou listovou, komplexem vitaminů B a antikoagulačními léky přispět k otěhotnění a donošení plodu (Macek et al., 2002). Výsledky zahraničních studií jsou rozdílné v tom, že někteří autoři našli spojitost mezi opakovanými potraty a trombofilními mutacemi a jiní nenalezli. Různí se i to, které konkrétní mutace jsou za to zodpovědné. V rámci výzkumu autoři vždy vyšetřili zároveň kontrolní skupinu fertilních žen a vypočítali, zda se počty nalezených mutací mezi oběma skupinami statisticky významně liší. Tak mohli určit, zda je v jejich souboru žen spojitost mezi danou mutací a spontánními aborty (případně neúspěchy fertilizaci in vitro), nebo není.

8.2 Léčebně preventivní opatření v souvislosti s trombofilním stavem

Zjištění trombofilní mutace musí být interpretováno v souvislosti s anamnestickými a klinickými souvislostmi. Je nutno rozlišovat hematologické souvislosti a genetickou problematiku pacientů, u kterých se zjistí nějaké trombofilní mutace. Hematolog je nejvíce zdůrazňován význam trombofilní mutace Leiden, vzhledem k zvýšené pravděpodobnosti výskytu trombóz, flebotrombóz, infarktům myokardu a plicním emboliím. Těmto pacientům většinou není doporučeno delší cestování, zvláště pokud mají mutaci Leiden v homozygotním stavu.

Z genetického hlediska nejsou ještě dostatečně oceněny mutace MTHFR C677T a mutace MTHFR A1298C ve vztahu k rozštěpovým vadám – zejména k rozštěpům páteře.

U všech mutací by měly být aplikovány zásady prekoncepční péče dle nutrigenomických zásad (hlavně zvýšení příjmu kyseliny listové).

U trombofilních stavů nezbytné opatření zábrany hyperkoagulace zejména ve vztahu k plánovaným operačním chirurgickým zákrokům.

V případě zjištění trombofilního stavu u některé z mutací MTHFR není jednotný názor, zda postupovat farmakologicky i u heterozygotů či jenom u homozygotů. Kauzální farmakologickou prevencí je dodávka Acidum folicum (kyselina listová) ve smyslu etiopatogeneticky jasného konstitučního deficitu u pacientů s mutací MTHFR.

Vhodné by bylo další vyšetření případné hypercholesterolemie, dyslipidemie, hladin homocysteinu jako případných dalších rizikových etiopatogenetických faktorů cévních trombotických příhod.

9 ZÁVĚR

1. Určit klinické konsekvence trombofilních mutací.

V souladu se zahraniční literaturou naše výsledky poukazují na klinické konsekvence trombofilních mutací jako jsou: opakované spontánní aborty, cévní mozková příhoda, ischemická choroba srdeční (především infarkt myokardu), trombóza, flebotrombóza, plicní embolie, varixy, aseptická nekrose kyčelního kloubu, ateroskleróza a stenóza aorty.

2. Zjistit a vyhodnotit trombofilní mutace u rizikových pacientů.

U žen, které prodělaly 2 a více spontánních abortů, byla nejčastěji zjištěna mutace MTHFR A1298C v homozygotním stavu a mutace MTHFR C677T v heterozygotním i homozygotním stavu. U pacientů s vrozenými vývojovými vadami (VVV) byla zjištěna mutace MTHFR C677T v homozygotním stavu.

U pacientů s infarktem myokardu (IM) byla nejčastěji zjištěna mutace Leiden a mutace MTHFR A1298C současně, mutace MTHFR A1298C v homozygotním a mutace MTHFR C677T v homozygotním stavu.

Pacienti s ICHS měli nejčastěji mutaci MTHFR C677T v homozygotním stavu a mutaci MTHFR A1298C v heterozygotním stavu.

U pacientů s plicní embolií byla nejčastěji zjištěna mutace Leiden.

Trombózu prodělali nejčastěji pacienti s mutací Leiden a mutací Leiden + MTHFR C677T současně.

Také u pacientů s flebotrombózou byla nejčastěji zaznamenána mutace Leiden.

U pacientů s cévní mozkovou příhodou (CMP) byla nejčastěji zjištěna mutace MTHFR C677T v homozygotním stavu.

Mutace MTHFR C677T a MTHFR A1298C byla tedy zachyceny především u pacientů s CMP, IM a ICHS. Mutace Leiden byla nejčastěji zachycena u pacientů s trombózou, flebotrombózou a plicní embolií.

3. Ověřit familiární výskyt trombofilních mutací.

Ověřili jsme familiární výskyt trombofilních mutací. Všichni pacienti zdělili trombofilní mutace po jednom nebo obou rodičích. Žádnou čerstvou mutaci jsme nezaznamenali. Mutace FV Leiden je děděna autozomálně dominantním způsobem. Mutace FII protrombinu je děděna autozomálně dominantním způsobem. Mutace MTHFR C677T a MTHFR A1298C jsou děděny autozomálně neúplně dominantně.

4. Popsat výskyt trombofilních mutací u pacientů s opakovanými aborty.

U žen s opakovanými aborty byly nejčastěji zjištěny mutace MTHFR C677T v homozygotním stavu a mutace MTHFR A1298C v homozygotním stavu. Mutace MTHFR C677T v homozygotním stavu byla také zjištěna u 4 pacientů s VVV (rozštěpy).

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

a) literární zdroje

1. Adams, M., Smith, P. D., Martin, D., et al.: *Genetic analysis of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for myocardial infarction*. Mont. Jour. Of the Assoc. Of Physic., 89 (6): 437 – 444, 1996.
2. Arias, F., Romero, R., Joist, H., et al.: *Thrombophilia: a mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta*. J. Matern. Fetal. Med., 7: 277 - 284, 1998.
3. Baglin, T., Luddington, R., et al.: *Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study*. Lancet, 362: 523 - 526, 2003.
4. Baranovskaya, S., Kudinov, S., Fomicheva, E., et al.: *Age as a risk factor for myocardial infarction in Leiden mutation carriers*. Mol. Genet. Metab. Jun, 64 (2): 155 - 7, 1998.
5. Beauchamp, N. J., Dykes, A. C., Parikh, N., Campbell Tait, R., Daly, M. E.: *The prevalence of, and molecular defects underlying, inherited protein S deficiency in the general population*. Br. J. Haematol., 125: 647 – 654, 2004.
6. Becker, R. C.: *Textbook of coronary thrombosis and thrombolysis*. Kluwer Academic Publishers: 65 – 66, 1997.
7. Behjati, R., Modarressi, M. H., Jeddi-Tehrani, M., et al.: *Thrombophilic mutations in Iranian patients with infertility and recurrent spontaneous abortion*. Ann. Hematol., 85 (4): 268 - 271, 2006.
8. Bertina, R. M., Koeleman, B. P., Koster, T., et al.: *Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to Activated Protein C*. Nature, 369: 765 – 774, 1994.
9. Blatný, J.: *Prevence žilní tromboembolické nemoci v pediatrii. Doporučení pro klinickou praxi*. XII. Pařížkovy dny, Brno: 2 – 3, 2006.
10. Bouchard, B. A., Tracy, P. B.: *Platelets, leukocytes, and coagulation*. Current Opinion in Hematology: 263 – 269, 2001.

11. **Brenner, B., Hoffman, R., Blumenfeld, Z., et al.:** *Gestational outcome in thrombophilic women with recurrent pregnancy loss treated by enoxaparin.* Thromb. Haemost., 83: 693 - 697, 2000.
12. **Brenner, B., Marder, V. J., Conard, J.:** *Women's issues in thrombosis and hemostasis.* Semin. Thromb. Hemost.: 81 – 85, 2002.
13. **Comp, P., Esmon, C.:** *Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S.* N. Engl. J. Med., 311: 1525 – 1528, 1984.
14. **Copp, A. J, et al.:** *The embryonic development of mammalian neural tube defect.* Prog. Neurobiol, 35: 363 – 405, 1990.
15. **Cushman, M.:** *Inherited risk factors for venous thrombosis.* Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program): 452 – 457, 2005.
16. **Dahlbäck, B., Carlsson, M., Svensson, P. J.:** *Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1004 – 1008, 1993.
17. **Dahlbäck, B.:** *Blood coagulation.* Lancet, 355: 1627 – 1632, 2000.
18. **De Stefano, V., et al.:** *Interaction between hyperhomocysteinemia and inherited thrombophilic factors in venous thromboembolism.* Sem. Tromb. Hemost., 26: 305 – 311, 2000.
19. **De Stafano, V., Martinelli, I., Mannucci, P. M., Pacironi, K., et al.:** *The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation.* N. Engl. J. Med., 341: 801 – 6, 2001.
20. **Dekker, G. A., Doetzlich, P. M., et al.:** *Underlying disorders associated with severe early onset preeclampsia.* Am. J. Obstet. Gynecol., 173: 1042 – 1048, 1995.
21. **Delis, K. T., Hunt, N., Strachan, R. K., et al.:** *Incidence, natural history and risk factors of deep vein thrombosis in elative knee arthroscopy.* Thromb. Haemost., 86: 817 – 821, 2001.
22. **Den Heijer, M., Lewington, S., Clarke, R.:** *Homocystein, MTHFR a riziko žilní trombózy: meta-analýza publikovaných epidemiologických studií.* J. Thromb. Haemost., 3 (2): 292 – 299, 2005.
23. **Doplen, D.:** *The plasminogen (fibrinolytic) system.* Thromb. Haemost., 82: 259 - 270, 1999.
24. **Dulíček, P., Kalousek, I., Malý, J.:** *Hormonální antikoncepce a tromboembolická nemoc – Jak to je ve skutečnosti.* Inter. Med., 8: 8, 2002.

25. Egerberg, O.: *Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia*. Thromb. Diath. Haemorrh., 13: 516 – 530, 1965.
26. Ertlová, F., Mucha, J., et al.: *Přednemocniční neodkladná péče*, Brno: NCO NZO: 229 - 236, 2004.
27. Faioni, E. M., Franchi, F., Bucciarelli, P., et al.: *Coinheritance of the HR2 haplotype in the factor V gene confers an increased risk of venous thromboembolism to carriers of factor V R506Q (factor V Leiden)*. Blood, 94: 3062 – 3066, 1999.
28. Finan, R. R., Tamim, H., Ameen, G., Sharida, H. E., et al.: *Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population*. Am. J. Hematol., 71 (4): 300 - 305, 2002.
29. Friedrich, P. W., Sanson, B. J., Simioni, P., et al.: *Frequency of pregnancy – related venous thromboembolism in anticoagulant factor deficient women. Implications for prophylaxis*. Intern. Med., 125: 955 – 960, 1996.
30. Frosst, P., et al.: *A candidate genetic risk-factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase*. Nat. Genet., 10: 111 – 113, 1995.
31. Geerts, W. H., Heit, J. A., Clagett, G. P., et al.: *Prevention of venous thromboembolism*. Chest., 119: 132S – 175S, 2001.
32. Geerts, W. H., Pineo, G. F., Heit, J. A., et al.: *Prevention of venous thromboembolism: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy*. Chest. Sept., 126 (3 Suppl.): 338S – 400S, 2004.
33. Gehring, N. H., Frede, U., Neu-Yilik, G., Hundsdoerfer, P., et al.: *Increased deficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia*. Nat. Genet., 28: 389 – 392, 2001.
34. Giesen, P. L., Rauch, U., Bohrmann, B., Kling, D., et al.: *Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis*. PNAS, 96: 2311 – 2315, 1999.
35. Godet, P. G., May, G. R., Sutherland, L. R.: *Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease*. Gut, 37, 5: 668 – 675, 1995.
36. Goracy, I., Goracy, J., Suliga, M.: *C677T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in patients with myocardial infarction*. Pol. Arch. Med. Wewn., 102 (4): 849 - 854, 1999.
37. Goyette, P., et al.: *Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of DNA, mapping and mutation identification*. Nat. Genet., 7: 95 – 200, 1994.

38. Griffin, J., Evatt, B., Zimmerman, T., et al.: *Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease*. J. Clin. Invest., 68: 1370 – 1373, 1981.
39. Hájek, Z.: *Rizikové a patologické těhotenství*. Praha, Grada: 176 - 177, 2004.
40. Huang, Z. F., Higuchi, D., et al.: *Tissue factor pathway inhibitor gene disruption predeces intrauterine lethality in mice*. Blood, 90: 944 – 951, 1997.
41. Chan, W., Lee, C. K., Kwong, Y. L., et al.: *A novel mutation of Arg 306 of factor V gene in Hong Kong Chinese*. Blood, 91: 1135 – 1139, 1998.
42. Kapiotis, S., Jilma, B., et al.: *Improved characteristics of APC-resistance assay: Coatest APC resistance by predilution of samples with factor V deficient plasma*. Am. J. Clin. Pathol., 106: 588 – 593, 1996.
43. Karetová, D.: *Hyperkoagulační stavy*. Lékařské listy in Zdravotnické noviny, č. 11: 22 - 25, 2002.
44. Kearon, C.: *Epidemiology of venous thromboembolism*. Semin. Vasc. Med., 1: 7 – 25, 2001.
45. Koster, T., Blann, A. D., Briet, E., et al.: *Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis*. Lancet, 345: 152 – 155, 1995.
46. Kupferminc, J. M., Eldor, A., Steinman, N., et al.: *Increase frequency of genetic thrombophilia in woman with complications of pregnancy*. N. Engl. J. Med., 340: 9 – 13, 1999.
47. Kvasnička, J., et al.: *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. Praha: Grada: 51 - 57, 2003a.
48. Kvasnička, J.: *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*, Praha: Grada: 57, 2003b.
49. Kvasnička, J.: *Trombofilie*. Lékařské listy in Zdravotnické noviny, č. 39: 8 – 18, 2003.
50. Kvasnička, J.: *Žilní a tepenná trombofilie*. Interv. Akut. Kardiol., 2: 23 – 29, 2003c.
51. Lane, D. A, et al.: *Antithrombin III: A database of mutations*. Thromb. Haemost., 66: 657 – 661, 1991.
52. Lay, M. J., Wittwer, C. T.: *Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR*. Clin. Chem., 43: 2262 – 2265, 1997.
53. Legnani, C., Palareti, G., Biagi, R., et al.: *Activated protein C resistance: a comparison between two clotting assays and their relationship to the presence of the factor V Leiden mutation*. Br. J. Haematol., 93: 694 – 699, 1996.

- 54. Lockwood, C. J.:** *Heritable coagulopathies in pregnancy.* Obstetrical and gynecological surfy, 54(12): 754 – 765, 1999.
- 55. Loscalzo, J., Schafer, A. I.:** *Thrombosis and hemorrhagie.* Lippincott, Williams and Wilkins: 591, 2003.
- 56. Ma, J., Stampfer, M. I., Hennekens, CH., et al.:** *The methylentetrahydrofolate reductase gene is associated with increased cardiovascular risk in Japan, but not in other populations.* Atherosclerosis, 153: 161 – 168, 2000.
- 57. Macek, M., Vilímová, Š., Potužníková, P., Yurov, Y., et al.:** *Využití lékařské genetiky v reprodukční medicíně.* Čas. Lék. čes., 1: 28 - 34, 2002.
- 58. Maiello, M., Torella, M., Caserta, R., et al.:** *Hypercoagulability during pregnancy: evidence for thrombophilic state.* Minerva Gynecol, 58: 417 – 424, 2006.
- 59. Malý, M.:** *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi.* Grada, Praha: 45 – 237, 2004.
- 60. Mandel, H., et al.:** *Coexistence of hereditary homocysteinuria and factor V Leiden.* N. Engl. J. Med., 334: 764 – 766, 1996.
- 61. Mannucci, P. M., Tripodi, A., et al.:** *Markers of procoagulant imbalance in patients with inherited thrombophilic syndromes.* Thromb. Haemost., 67: 200 – 202, 1992.
- 62. McClatchey, K. D.:** *Clinical laboratory medicine, 2nd Edition.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia: 1051 - 1052, 2002.
- 63. Midwifery, J.:** *Womens Healt,* 49 (1): 51 - 52, 2004.
- 64. Miletich, J. P., Sherman, I., Broze, G.:** *Absence of thrombosis in subjects with heterozygot protein C deficiency.* N. Engl. J. Med., 317: 44 – 48, 1987.
- 65. Monkovic, D. D., Tracy, P. B.:** *Activation of human factor V by factor Xa and thrombin.* Biochemistry, 29: 1118 – 1128, 1990.
- 66. Monroe, D. M., Hoffman, M., Roberts, H. R.:** *Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cells to platelets.* Blood Coagul. Fibrinolysis, 7: 459 – 460, 1996.
- 67. Nachman, R. L., Silverstein, R.:** *Hypercoagulable states.* Ann. Int. Med., 119: 819 – 827, 1993.
- 68. Nakamura, S., et al.:** *Simultaneous detection of methylentetrahydrofolate reductase gene polymorphism, C677T and A1298C, by melting curve analysis with LightCycler.* Analytical Biochemistry, 306: 340 – 343, 2002.
- 69. Navrátil, L. a kol.:** *Vnitřní lékařství – Pro nelékařské zdravotnické obory.* Grada, Praha: 225 – 226, 2008.

- 70. Nejedlá, M., Šafránková, A.:** *Interní ošetřovatelství I.* Praha, Grada: 188 – 190, 2006.
- 71. Olds, R. J., Lane, D. A., Ireland, H., et al.:** *Novel point mutations leading to type I antitrombin deficiency and thrombosis.* Br. J. Haematol., 78: 408 – 413, 1991.
- 72. Penka, M. a kol.:** *Hematologie I: Neonkologická hematologie.* Grada, Praha: 140 - 143, 2001.
- 73. Perry, D. J., Pasi, K. J.:** *Hemostasis and thrombosis protocols.* Humana Press, New Jersey: 12 – 13, 1999.
- 74. Poort, S. R., Rosendaal, F. R., Reitsma, P. H., Bertina, R. M.:** *A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.* Blood, 15: 3698 – 3703, 1996.
- 75. Preissner, K. T.:** *Biochemistry and physiology of blood coagulation and fibrinolysis.* Haemost., 24 (2): 84 - 93, 2004.
- 76. Preston, F. E., Rosendaal, F. R., Walker, I. D., et al.:** *Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia.* Lancet, 348: 913 – 916, 1996.
- 77. Procházka, M.:** *Tromboembolická nemoc v těhotenství.* Gynekolog., 2: 79 – 82, 1999.
- 78. Procházka, M.:** *Trombofilní stavy s porodnictvím II.* Praktická gynekologie, 6: 18 - 22, 2004.
- 79. Procházka, M.:** *Výskyt mutací genu faktoru V. Leiden, protrombinu a metylenetetrahydrofolátreduktázy u pacientek s preeklampií.* Česká Gynekologie, 68: 166, 2003.
- 80. Raušová E., Hadačová I., Macek M.:** *Hereditární trombofilie - jeden z modelů molekulární medicíny.* Klin. Biochem. Metab., 13 (34), No. 2: 68 - 76, 2005.
- 81. Redakce Zdravotnických novin:** *Defekty inhibitorů koagulace a fibrinolytického potenciálu, rezistence na aktivovaný protein C.* Lékařské listy in Zdravotnické noviny, 43: 2 - 8, 2000.
- 82. Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Lindpaintner, K., Stampfer, M. J., Eisenberg, P. R.:** *Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men.* N. Engl. J. Med., 332: 912 - 917, 1995.
- 83. Rosenblatt, D. S. et al.:** *Methylenetetrahydrofolate Reductase in Cultured Human cells. II. Genetic and Biochemical Studies of Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency.* Pediatric Research, 11: 1142, 1977.

- 84. Rosendaal, F. R., Koster, T., Vandenbroucke, J. P., Reitsma, P. H.:** *High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance).* Blood, 85: 1504 – 1508, 1995.
- 85. Seligsohn, U., Lubetsky, A.:** *Genetic susceptibility to venous thrombosis.* N. Engl. J. Med., 344: 1222 - 1231, 2001.
- 86. Schindler, O. S., Dalziel, R.:** *Post-thrombotic syndrome after total hip or knee arthroplasty: incidence in patients with asymptomatic deep venous thrombosis.* J. Orthop. Surg. Aug., 13 (2): 113 – 119, 2005.
- 87. Silverstein, M. D., Heit, J. A., Mohr, D. N., et al.:** *Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: A 25-year population-based study.* Arch. Intern. Med., 158: 585 - 589, 1998.
- 88. Sršen, Š., Sršňová, K.:** *Základy klinické genetiky a jej molekulárna podstata. 4. prepracované a rozšírené vyd.* Martin, Osveta: 25 - 177, 2005.
- 89. Toglia, M. R., Weg, J. G.:** *Venous thromboembolism during pregnancy.* N. Engl. J. Med., 335: 108 - 112, 1996.
- 90. Tripodi, A., Franchi, F., Krachmalnikoff, A., Mannucci, P. M.:** *Asymptomatic homozygous protein C deficiency.* Haematol., 83 (3): 152 – 155, 1990.
- 91. Turgeon, M. L.:** *Clinical hematology – theory and procedures.* Lippincott Williams and Wilkins: 389, 2005
- 92. Van der Put, N. M. J., et al.:** *A second common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?* Am. J. Hum. Genet., 62: 1043 – 1054, 1998.
- 93. Vanderbroucke, J. P., et. al.:** *Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who carriers of factor V Leiden mutation.* Lancet, 344: 1453 – 158, 1999.
- 94. Williamson, D., Brown, K., Luddington, R., et al.:** *Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306Thr) associated with resistance to activated protein C.* Blood, 91: 1140 – 1141, 1998.
- 95. Žák, A.:** *Homocystein.* In: Aschermann, M., et al.: Kardiologie. Praha: Galén, 2004.

b) internetové zdroje

- I.** http://www.rescue112.cz/priznaky-a-projevy-nemoci/zilni-tromboza_-hluboka-flebotromboza, (citováno dne 28. 4. 2010).
- II.** http://www.zbynekmlcoch.cz/info/ostatni_obory/plicni_embolie_priciny_priznaky_symptomy_lecba_nasledky_komplikace.html, (citováno dne 28. 4. 2010).
- III.** <http://cache.eb.com/eb/image?id=98328&rendTypeId=4>, (citováno dne 28. 4. 2010).

11 PŘÍLOHY

11.1 Tabulky

Tabulka č. 2: Věková struktura mého souboru

věk	0 - 10	11 - 20	21 - 30	31 - 40	41 - 50	51 - 60	61 - 70	71 - 80	81 - 90
žen	6	16	88	43	28	17	6	0	2
mužů	4	10	22	21	12	17	6	2	0
celkem	10	26	110	64	40	34	12	2	2

Tabulka č. 3: Výčet diagnóz, pro které byli pacienti testováni na trombofilní mutace

Číslo diagnózy	Název diagnózy	Počet pacientů
D681	Dědičný nedostatek faktoru XI	5
D688	Jiné určené vady koagulace	9
D689	Vada koagulace, NS	9
E889	Poruchy metabolismu, NS	26
I258	Jiné formy chronické ischemické nemoci (choroby) srdeční	3
I259	Chronická ischemická nemoc (choroba) srdeční, NS	4
I269	Plicní embolie bez akutního cor pulmonale	6
I639	Mozkový infarkt, NS	10
I743	Embolie a trombóza tepen dolních končetin	8
M244	Opakovaná dislokace a subluxace	3
M414	Nervově svalová skolióza	1
O200	Hrozící potrat	8
O351	Péče o matku pro (podezření) chromosomální aberace plodu	4
O352	Péče o matku pro (podezření) vrozené nemoci plodu	6
Q764	Jiné vrozené vady páteře bez spojení se skoliózou	2
Q780	Osteogenesis imperfecta	7
Q788	Jiné určené osteochondrodysplazie	1
Q950	Balancované translokace a inserce u jedince bez klinických projevů	3
Q999	Abnormalita chromosomů, NS	1
T829	Neurčená komplikace srdeční a cévní protetické pomůcky, implantátu a štěpu	3
Z359	Dohled nad vysoce rizikovým (ohroženým) těhotenstvím, NS	2
Z827	Vrozené vady, deformace a chromosomální abnormality v rodinné anamnéze	130
Z832	Nem.krve,krvetvor.orgánů a některá onem.postihující mechanismus imunity v rodinné anamnéze	6
Z848	Jiné určené stavy v rodinné anamnéze	44

Tabulka č. 4a: Trombofilní mutace a jejich zastoupení

typ mutace	homozygotů	heterozygotů	celkem	celkem %
MTHFR C677T	26	58	84	28 %
MTHFR A1298C	30	54	84	28 %
Leiden	1	27	28	9,3 %
FII	0	5	5	1,7 %

Tabulka č. 4b: Vícečetné trombofilní mutace a jejich zastoupení

typy mutací	het/homo	homo/het	het/het	celkem	celkem %
MTHFR C677T + A1298C	0	0	46	46	15,3 %
MTHFR C677T + Leiden	1	5	14	20	6,7 %
MTHFR A1298C + Leiden	3	5	8	16	5,3 %
Leiden + FII	0	0	1	1	0,3 %
MTHFR C677T + FII	0	1	2	3	1 %
MTHFR A1298C + FII	0	0	1	1	0,3 %

Tabulka č. 4c: Vícečetné trombofilní mutace a jejich zastoupení

typy mutací	homo/het/ het	všechny heteroz.	celkem	celkem %
MTHFR C677T + A1298C + Leiden	0	3	3	1 %
MTHFR C677T + A1298C + FII	0	1	1	0,3 %
MTHFR C677T + Leiden + FII	1	1	2	0,6 %
MTHFR A1298C + Leiden + FII	2	1	3	1 %
MTHFR C677T + A1298C + Leiden + FII	0	3	3	1 %

Tabulka č. 5: Klinické konsekvence u pacientů s trombofilní mutací MTHFR C677T
v heterozygotním stavu

MTHFR C677T heterozygoti	žen	mužů	celkem	celkem % (n = 58)
spontánní abort	9	0	9	31 (n = 29)
CMP	4	3	7	12
flebotrombóza	2	1	3	5,2
ICHS (kromě IM)	5	0	5	8,6
infarkt myokardu	5	3	8	13,8
trombóza	2	0	2	3,4
varixy	4	0	4	6,9
žádné komplikace	22	4	26	44,8

Tabulka č. 6: Klinické konsekvence u pacientů s trombofilní mutací MTHFR C677T
v homozygotním stavu

MTHFR C677T homozygoti	žen	mužů	celkem	celkem % (n = 26)
spontánní abort	10	0	10	47,6 (n = 21)
CMP	10	3	13	50
ICHS (kromě IM)	3	2	5	19,2
infarkt myokardu	4	3	7	27
rozštěpy	1	1	2	7,7
spina bifida	1	1	2	7,7
trombóza	2	0	2	7,7
žádné komplikace	2	0	2	7,7

Tabulka č. 7: Klinické konsekvence u pacientů s trombofilní mutací MTHFR A1298C
v heterozygotním stavu

MTHFR A1298C heterozygoti	ženy	muži	celkem	celkem % (n = 54)
spontánní abort	8	0	8	34,8 (n = 23)
CMP	3	2	5	9,3
ICHS (kromě IM)	7	1	8	14,8
infarkt myokardu	6	2	8	14,8
plicní embolie	0	1	1	1,8
varixy	4	0	4	7,4
žádné komplikace	19	9	28	51,9

Tabulka č. 8: Klinické konsekvence u pacientů s trombofilní mutací MTHFR A1298C
v homozygotním stavu

MTHFR A1298C homozygoti	ženy	muži	celkem	celkem % (n = 30)
spontánní abort	9	0	9	64 (n = 14)
CMP	3	1	4	13,3
ICHS (kromě IM)	0	1	1	3,3
infarkt myokardu	6	3	9	30
plicní embolie	1	0	1	3,3
varixy	2	0	2	6,7
žádné komplikace	9	1	10	33,3

Tabulka č. 9: *Klinické konsekvence u pacientů s trombofilní mutací Leiden
v heterozygotním i homozygotním stavu*

Leiden	ženy	muži	celkem	celkem % (n = 28)
spontánní abort	4	0	4	23,5 (n = 17)
flebotrombóza	4	0	4	14,3
infarkt myokardu	2	2	4	14,3
plicní embolie	3	2	5	17,8
trombóza	2	2	4	14,3
žádné komplikace	5	6	11	39,3

Tabulka č. 10: *Klinické konsekvence u pacientů s protrombinovou mutací
v heterozygotním stavu*

FII heterozygoti	ženy	muži	celkem	celkem % (n = 5)
trombóza	3	2	5	100
žádné komplikace	0	0	0	0

Tabulka č. 11: Klinické konsekvence u pacientů s mutacemi MTHFR C677T a MTHFR A1298C současně

MTHFR C677T + A1298C	žen	mužů	celkem	celkem % (n = 46)
spontánní abort	6	0	6	30 (n = 20)
CMP	7	2	9	19,6
flebotrombóza	1	0	1	2,1
ICHS (kromě IM)	4	2	6	13
infarkt myokardu	7	2	9	19,6
plicní embolie	1	0	1	2,1
trombóza	0	1	1	2,1
varixy	3	0	3	6,5
žádné komplikace	12	7	19	41,3

Tabulka č. 12: Klinické konsekvence u pacientů s mutacemi MTHFR C677T a Leiden současně

MTHFR C677T + Leiden	žen	mužů	celkem	celkem % (n = 20)
spontánní abort	2	0	2	25 (n = 8)
aseptická nekrose	1	2	3	15
ateroskleróza	2	0	2	10
CMP	4	0	4	20
ICHS (kromě IM)	1	1	2	10
infarkt myokardu	2	0	2	10
plicní embolie	1	0	1	5
trombóza	1	2	3	15
varixy	3	0	3	15
žádné komplikace	2	3	5	25

Tabulka č. 13: Klinické konsekvence u pacientů s mutacemi MTHFR A1298C a Leiden současně

MTHFR A1298C + Leiden	žen	mužů	celkem	celkem % (n = 16)
spontánní abort	3	0	3	50 (n = 6)
CMP	3	3	6	37,5
ICHS (kromě IM)	0	2	2	12,5
infarkt myokardu	2	3	5	31,3
plicní embolie	0	1	1	6,3
stenóza aorty	1	0	1	6,3
žádné komplikace	1	2	3	18,8

Tabulka č. 14: Souhrnný přehled klinických konsekvencí u pacientů s trombofilními mutacemi

celkem	žen	mužů	celkem	celkem % (n = 300)
spontánní abort	51	0	51	36,7 (n = 139)
aseptická nekrose	1	2	3	1
ateroskleróza	3	0	3	1
CMP	34	14	48	16
flebotrombóza	7	2	9	3
ICHS (kromě IM)	20	10	30	10
infarkt myokardu	35	21	56	18,7
plicní embolie	7	6	13	4,3
rozštěpy	1	1	2	0,7
spina bifida	1	1	2	0,7
stenóza aorty	1	0	1	0,3
trombóza	11	8	19	7,3
varixy	19	0	19	7,3
žádné komplikace	74	35	109	36,3

Tabulka č. 15: Výskyt jednotlivých klinických konsekvencí u běžné populace podle ÚZIS
(přepočteno na 100 000 obyvatel)

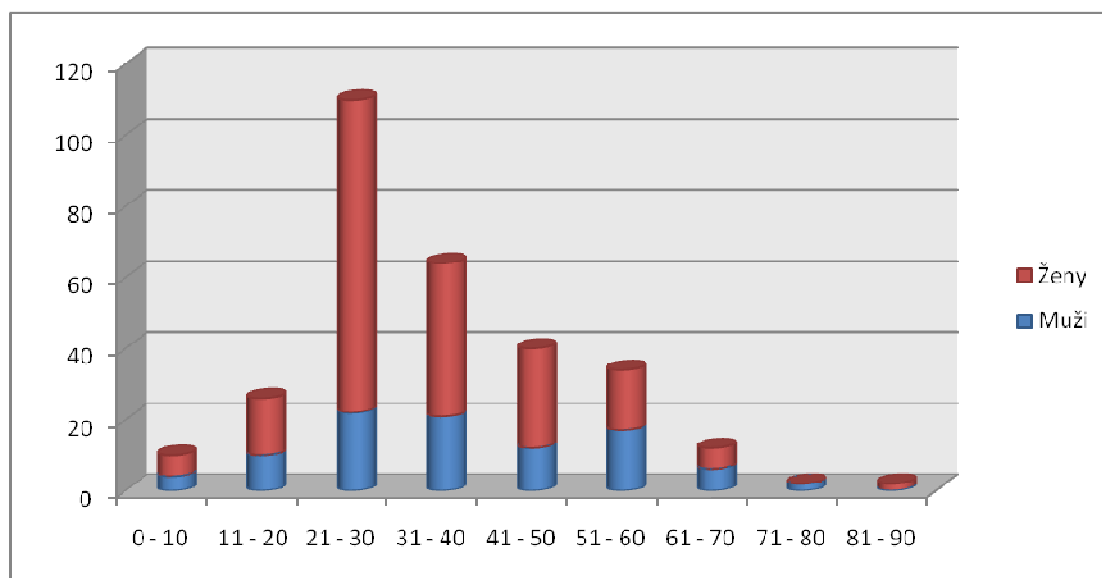
běžná populace podle ÚZIS	počet případu na 100 000 obyvatel za rok
VARIXY	156,4
CMP	251
INFARKT MYOKARDU	234
ICHS (včetně infarktů myokardu)	428
FLEBOTROMBÓZA	167
TROMBÓZA	171
PLICNÍ EMBOLIE	75
SPONTÁNNÍ ABORTY	138

Tabulka č. 16: Ukázka familiárního výskytu trombofilních mutací

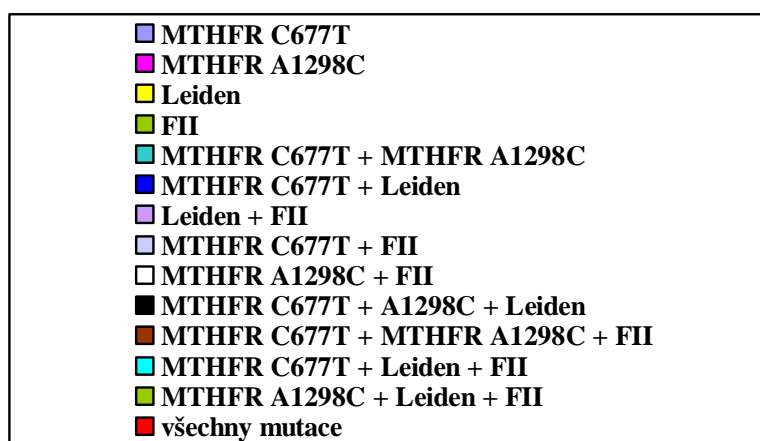
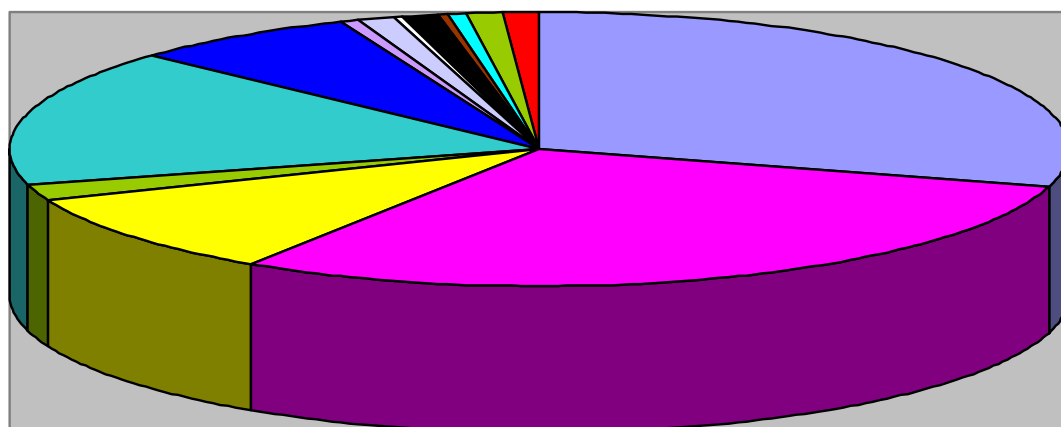
matka	otec	dítě	dítě
<ul style="list-style-type: none"> F II heterozygot MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden homozygot MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot F II heterozygot 	
<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot MTHFR C677T heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot F II heterozygot MTHFR A1298C homozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden homozygot F II heterozygot MTHFR C677T heterozygot MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot F II heterozygot MTHFR A1298C heterozygot
<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot
<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> žádná mutace 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot 	
<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot MTHFR A1298C homozygot 	
<ul style="list-style-type: none"> MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot F II heterozygot MTHFR C677T heterozygot MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot F II heterozygot MTHFR A1298C homozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot F II heterozygot MTHFR C677T heterozygot MTHFR A1298C heterozygot
<ul style="list-style-type: none"> MTHFR C677T homozygot 	<ul style="list-style-type: none"> MTHFR C677T heterozygot MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> MTHFR C677T homozygot 	<ul style="list-style-type: none"> MTHFR C677T homozygot
<ul style="list-style-type: none"> MTHFR C677T homozygot 	<ul style="list-style-type: none"> žádná mutace 	<ul style="list-style-type: none"> MTHFR C677T heterozygot 	
<ul style="list-style-type: none"> MTHFR C677T heterozygot MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> MTHFR C677T heterozygot MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> MTHFR A1298C heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> MTHFR A1298C homozygot
<ul style="list-style-type: none"> MTHFR C677T heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> Leiden heterozygot MTHFR C677T heterozygot 	<ul style="list-style-type: none"> MTHFR C677T heterozygot

11.2 Grafy

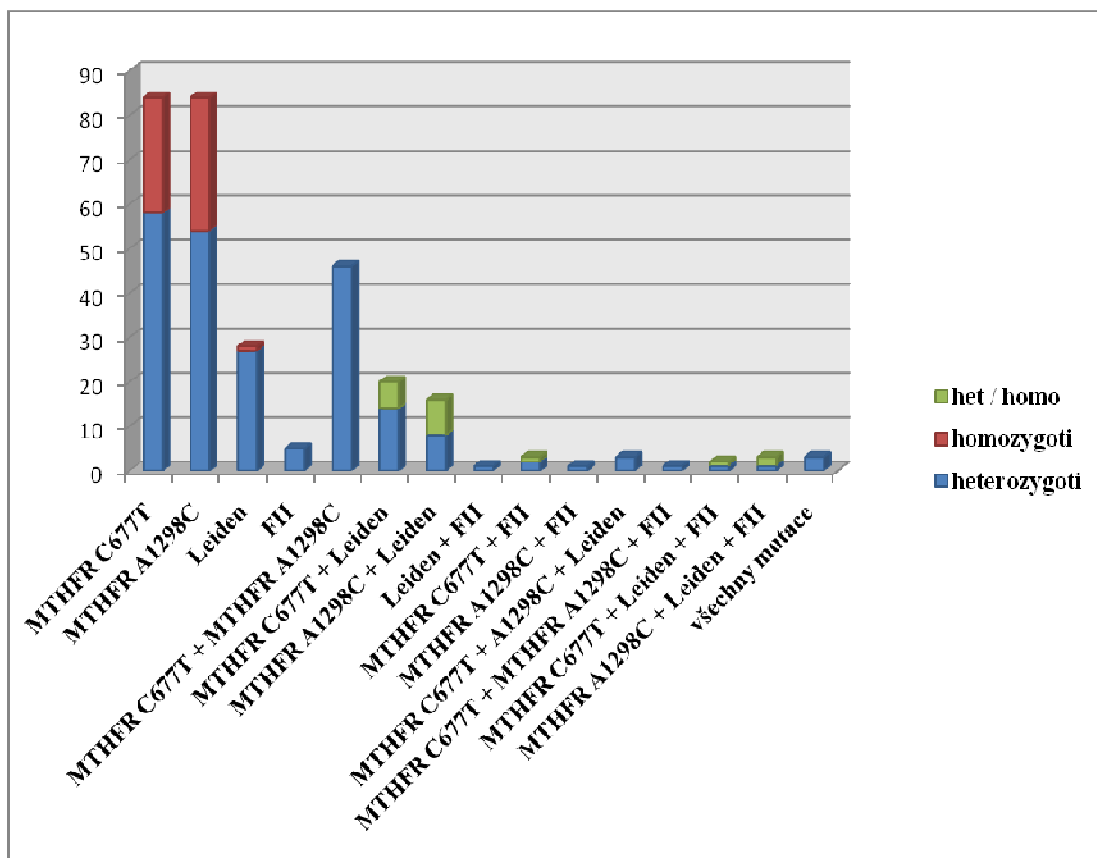
Graf č. 1: Věková struktura mého souboru



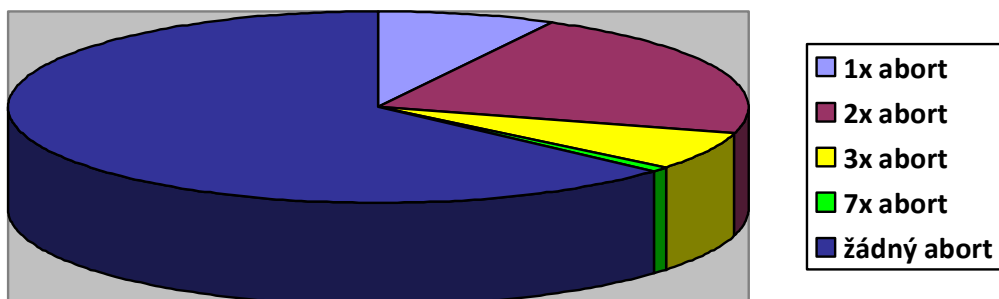
Graf č. 2a: Poměry zastoupení jednotlivých trombofilních mutací a vícečetných trombofilních mutací z celkového počtu sledovaných pacientů (n = 300 pacientů)



Graf č. 2b: Poměry heterozygotů (modře), homozygotů (červeně) a složených heterozygotů / homozygotů (zeleně) u jednotlivých trombofilních mutací a vícečetných trombofilních mutací (n = 300 pacientů)



Graf č. 3: Spontánní aborty a trombofilní mutace



Graf č. 4: Trombofilní mutace a klinické konsekvence

